
**Methoden zur Charakterisierung statischer
und dynamischer Zelleigenschaften
in 3D-Präparaten mit Hilfe der
Zweiphotonen-Mikroskopie**

Sabine Betts



München 2014

Aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Institutsdirektor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hans Kretzschmar FRCPATH

**Methoden zur Charakterisierung statischer
und dynamischer Zelleigenschaften
in 3D-Präparaten mit Hilfe der Zweiphotonen-Mikroskopie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sabine Betts
aus Erding

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Jochen Herms
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann
Mitbetreuung durch:	Prof. Dr. Rainer Uhl
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	17.02.2014

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Methoden zur Charakterisierung statischer und dynamischer
Zelleigenschaften in 3D-Präparaten mit Hilfe der Zweiphotonen-Mikroskopie**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift Doktorandin

„Ein Wissenschaftler benötigt vier Dinge:

*erstens einen Kopf zum Denken;
zweitens Augen zum Sehen;
drittens Geräte zum Messen;
und viertens - Geld.“*

Albert Szent-Györgyi (1893 - 1986), ungarisch-amerikanischer Mediziner und Biochemiker, erhielt 1937 den Nobelpreis für Medizin

Zusammenfassung

Aufwendige Experimente verlangen komplexe, an die Fragestellung angepasste Messmethoden, und deren Entwicklung ist oft eine Wissenschaft für sich. Im Falle der hier eingesetzten Zweiphotonenmikroskopie führten die Erfindung des Femtosekundenlasers und die Entwicklung des *Laserscanning*-Mikroskops dazu, dass sie sich heute für lichtmikroskopische Messungen in stark streuendem Gewebe etabliert hat. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Aufbau eines solchen Zweiphotonenmikroskops an die Anforderungen zweier konkreter Projekte angepasst.

Hierbei handelt es sich zum einen um eine in-vivo Anwendung zur Erforschung der Alzheimer-Demenz in Mäusen. Für eine reproduzierbare räumliche Ausrichtung des Versuchstiers wurde ein konventioneller Mikroskoptisch durch einen „Hexapod“ ersetzt. Ausgestattet mit sechs Achsen ermöglicht dieser hochpräzise Labortisch sowohl Translation als auch Rotation der Probe. Er wurde in die bestehende Software des Mikroskops eingebunden und konnte die Maus reproduzierbar so ausrichten, dass ihr implantiertes Schädelfenster genau in der Horizontalen liegt. Es konnte gezeigt werden, dass durch schräge Schädelfenster verursachte perspektivische Fehlinterpretationen der mikroskopischen Strukturen dadurch verhindert werden. Die Auswertung hierbei generierter Daten wird so verlässlicher. Der Hexapod verbessert damit die Konditionen für die chronische Mikroskopie und speziell für die Beobachtung von strukturellen Veränderungen über die Dauer von Wochen oder Monaten.

Für eine weitere, von der ersten unabhängige, Versuchsreihe wurde eine Benutzeroberfläche entwickelt, die es dem Experimentator erlaubt, selbstbestimmte Trajektorien in der Probe zu fahren. Es handelt sich dabei um Linienscans, die jedoch weder gerade noch eindimensional sein müssen. Vielmehr ist es möglich, dreidimensionalen Strukturen, wie beispielsweise Den-

druten, mit dem Laserfokus zu folgen und diese mit hoher Frequenz wiederholt abzuscanen. Durch Färbung der Zelle mit einem kalziumsensitiven Fluorophor können damit neuronale Reaktionen aufgezeichnet werden, für die gewöhnliche, zweidimensionale Scans deutlich zu langsam sind. Je nach Länge und Form der Trajektorie wurden Frequenzen von typischerweise 50 Hz bis 200 Hz erreicht.

Es wurde zusätzlich ein Modus für durch Sprünge verbundene, kleine zweidimensionale Scans entwickelt, dessen Funktionsweise an Neuronen eines Spinalganglions demonstriert wurde. Hier konnte die Reaktion umliegender Zellen auf die Zerstörung eines Neurons nachgewiesen werden, indem diese nacheinander wiederholt abgescannt wurden.

Summary

Elaborate experiments ask for complex, customized measuring techniques and their development is often a science in itself. In the case of two-photon microscopy the invention of the femtosecond laser and the development of the laser scanning microscope paved the way for its establishment in science. Optical microscopic measurements in highly scattering tissue were thereby made possible. Within the scope of this thesis a two-photon microscope setup was adapted to the specific requirements of two particular projects. This allows the approach of previously unanswered scientific questions.

Firstly, this involved an in-vivo application for research on Alzheimer's disease in mice. For a reproducible spatial alignment of the animal a conventional microscope stage was replaced by a „Hexapod“. Being equipped with six axes this highly precise device allows both translational and rotational motion of the sample. It was implemented into the existing microscope software and was able to reproducibly align the mouse in such a way that its implanted cranial window was exactly horizontal. It had been shown that perspective misinterpretation of microscopic structures due to a tilted cranial window could thereby be prevented. The analysis of generated data hence becomes more reliable. The Hexapod therefore improves the conditions for chronic imaging, especially the observation of structural changes over a period of weeks or months.

For a second project a user interface was developed that allows the scientist to determine a trajectory within the sample to be scanned. Microscopic structures, for example dendrites, can be tracked with the laser focus and repeatedly scanned with high frequency. However, unlike linescans, the trajectories are not necessarily one-dimensional or straight. By staining the cell with a calcium sensitive fluorophore neuronal reactions can be recorded that conventional,

two-dimensional scans are too slow for. Depending on the trajectory's length and shape frequencies of typically 50 Hz to 200 Hz were achieved.

Additionally, a mode for little two-dimensional scans connected by jumps was developed which was used on neurons bundled in a dorsal root ganglion. Here, the response of surrounding cells to the destruction of a neuron was detected by repeatedly scanning them one after the other.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	ix
Summary	xi
1. Einleitung: Zweiphotonenmikroskopie in der Wissenschaft	1
1.1. Fluoreszenzmikroskopie im Allgemeinen	1
1.1.1. Fluoreszenzmarker	1
1.1.2. Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie	2
1.1.3. Von der Weitfeld- zur Laser-Scanning-Mikroskopie	3
1.2. Zweiphotonenmikroskopie	4
1.2.1. Geschichte	4
1.2.2. Theorie	5
1.2.3. Anwendung der Zweiphotonenmikroskopie	8
1.2.4. Zweiphotonenmikroskopie und Dreidimensionalität	9
1.3. Zielsetzung	10
2. Versuchsaufbau	13
2.1. Experimenteller Aufbau des verwendeten Zweiphotonenmikroskops	13
2.2. Punktspreizfunktion des Systems	16
3. Ausrichtung der Probe für reproduzierbare, chronische in-vivo Aufnahmen	19
3.1. Motivation: Die Erforschung von Morbus Alzheimer an transgenen Mäusen	21
3.2. Materialien und Methoden	22

3.3. Ergebnisse	26
4. Trajektorienscan	31
4.1. Motivation: Anwendungen in biologischem Gewebe	32
4.1.1. Dendriten in der medialen oberen Olive im Hörsystem der Wüstenrennmaus	32
4.1.2. Neurone in Spinalganglien von Hühnerembryos	34
4.2. Materialien und Methoden	36
4.2.1. Hardware	36
4.2.2. Software	43
4.2.3. Präparation der Proben und Versuchsvorbereitungen	51
4.3. Ergebnisse	55
4.3.1. Positioniergenauigkeit der Voice Coil im Trajektorienscan	55
4.3.2. Kalziummessungen in biologischem Gewebe unter Verwendung des Trajektorienscans	59
5. Diskussion und Ausblick	67
5.1. Dreidimensionale Ausrichtung des Versuchstiers für in-vivo Langzeitstudien .	67
5.2. Trajektorienscans	69
A. Einzelmessungen zur Bestimmung der Punktspreizfunktion	75
B. Weitfeldbilder der markierten Glasoberfläche	77
C. Voice Coil Messungen	79
C.1. Sinusbewegungen	79
C.2. Dreieckbewegungen	87
C.3. Sprungbewegungen	96
C.4. Amplitudenkorrigierte Sinusbewegungen	98
C.5. Amplitudenkorrigierte Sprungbewegungen	106

D. Benutzeroberflächen zur Zerstörung eines Neurons	113
Abbildungsverzeichnis	115
Tabellenverzeichnis	117
Literaturverzeichnis	119
Danksagung	133

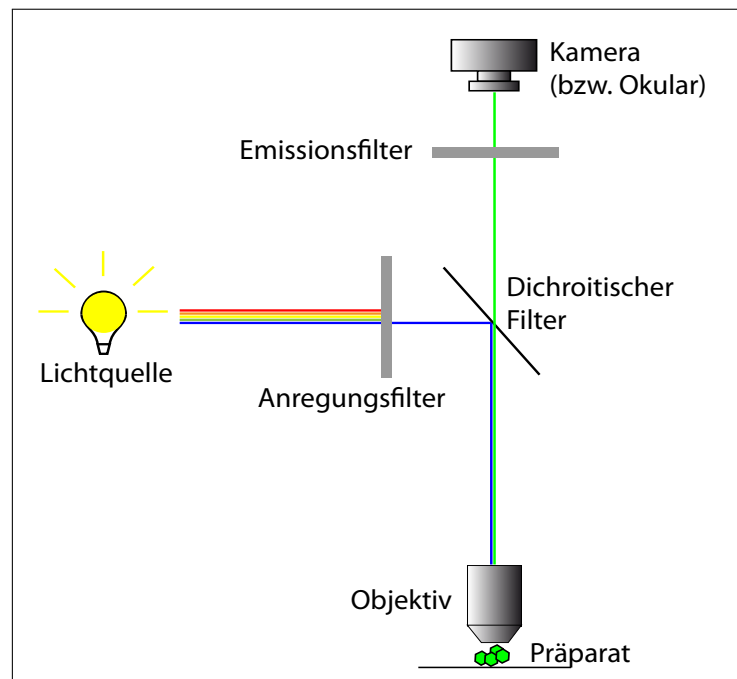
1. Einleitung: Zweiphotonenmikroskopie in der Wissenschaft

1.1. Fluoreszenzmikroskopie im Allgemeinen

1.1.1. Fluoreszenzmarker

Im Gegensatz zu anderen Methoden nutzt die Fluoreszenzmikroskopie Lichtquellen im Präparat selbst, um einen visuellen Kontrast herzustellen. Es gibt mittlerweile eine große Vielzahl an natürlich vorkommenden oder synthetisch hergestellten Markern, um bestimmte Strukturen gezielt sichtbar zu machen. Oft werden zum Beispiel fluoreszierende Proteine benutzt [Shi62, Cub95, Tsi98, Sha04, Sha05, Dav09, Pia10], die im Organismus unter dem entsprechenden Promotor am gewünschten Ort exprimiert werden, oder zugesetzte Fluorophore, die - ausgestattet mit reaktiven Gruppen oder an einen Antikörper gehängt - ein bestimmtes Zielmolekül finden und markieren [Che85, Tsi88, Tsi89, Muj93, Joh98, PV99, Cze01]. Auch anorganische Konstrukte aus Halbleiter-Nanokristallen, sogenannte Quantum Dots [Cha98, Lid04, Pin06, RG08], werden verwendet. Für die Beobachtung von Kalziumreaktionen - wie in Kap. 4 - stehen eine Reihe von Markern zur Verfügung, die in Verbindung mit Kalziumionen ihre Absorptions- oder Fluoreszenzeigenschaften ändern [Tsi80, Min89, Man08]. Für hochauflösende Techniken werden nun auch verstärkt photoschaltbare Fluorophore entwickelt, die beispielsweise durch Beleuchtung mit UV-Licht aktiviert werden oder ihre Emissionswellenlänge ändern [Luk05, FS08, Dem09].

Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines Epifluoreszenzmikroskops. Bei Weißlicht wird die gewünschte Anregungswellenlänge durch einen entsprechenden Filter bereitgestellt. Das Emissionslicht wird durch einen dichroitischen Spiegel vom Anregungslicht getrennt, nochmals gefiltert, um unerwünschtes Licht zu blocken, und schließlich von einer Kamera detektiert.



1.1.2. Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenz - erstmals 1819 von E. D. Clarke beschrieben [Cla19] und von G. G. Stokes benannt [Sto52] - ist eine Form der Lumineszenz. Durch Absorption eines Photons geht ein Molekül in einen angeregten, höheren quantenmechanischen Zustand über [Lak09, Val12]. Diese Energie wird dann nur teilweise wieder in Form eines Photons abgegeben, ein kleiner Teil geht strahlungsfrei zum Beispiel in Schwingungen über (siehe Abb. 1.2). Daher ist die Emissionswellenlänge (bei der konventionellen Einphotonenanregung) immer länger als die Anregungswellenlänge; dieses Phänomen ist als Stokes-Shift bekannt [Ros95]. Größere Wellenlänge bedeutet weniger Energie, da diese beiden Größen umgekehrt proportional zueinander sind: $E \propto \frac{1}{\lambda}$. Im Gegensatz zur Phosphoreszenz relaxiert das angeregte Molekül bei der Fluoreszenz sehr schnell wieder in den Grundzustand. Bei dieser sogenannten Lebensdauer handelt es sich typischerweise um einige Nanosekunden [Bas99]. In der Fluoreszenzmikroskopie wird die Tatsache ausgenutzt, dass Anregungs- und Emissionswellenlänge sich unterscheiden. Durch einen Strahlteiler und passende Filter ist es möglich, nur das Fluoreszenzlicht aus der Probe zu detektieren und so die mit den Fluorophoren markierten Strukturen sichtbar zu machen, siehe Abb. 1.1.

1.1.3. Von der Weitfeld- zur Laser-Scanning-Mikroskopie

In der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie wird das Signal im Fokus jedoch häufig von Hintergrundsignal ebenfalls fluoreszierender Bestandteile aus darüber oder darunter liegenden Schichten des Präparats überlagert [Ino06]. In der Konfokalmikroskopie - 1957 von Marvin Minsky zum Patent angemeldet [Min88] - wird dies durch eine Lochblende in der Zwischenbildebene des Detektionsstrahlengangs gelöst, so dass Photonen, die nicht aus der Fokusebene kommen, blockiert werden [Dav71, She78, Bra79]. Gleichzeitig wird durch eine Blende im Beleuchtungsstrahlengang, die in die Probe hinein abgebildet wird, nur ein in lateraler Richtung sehr begrenzter Bereich auf der Probe beleuchtet. Heute dienen meist Laser als Lichtquellen, so dass die Anregung auf einen Bereich der Größe des fokussierten Laserstrahls begrenzt wird. Es kann so nur Fluoreszenz aus einem Volumen im Femtoliterbereich in der Fokusebene auf den Detektor gelangen. Dies verbessert nicht nur das Verhältnis von Signal zu Hintergrund merklich, sondern kann bei nahezu geschlossener Lochblende auch die effektive Auflösung im Vergleich zur Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie erhöhen [Cox84, Car85].

Im Gegensatz zum Weitfeld-Verfahren, bei dem das Bild des Präparats ins Auge des Betrachters, bzw. auf einen Kamera-Chip, abgebildet wird, wird das Signal in der Konfokalmikroskopie durch Abrastern der Probe mit dem Laserstrahl Pixel für Pixel detektiert. Zusammengekommen entsteht schließlich ein zweidimensionales Bild. Durch Bewegung des Objektivs oder des Präparats in axialer Richtung kann ein Bildstapel aufgenommen werden.

In der Zweiphotonenmikroskopie wird das Problem des Hintergrundsignals aus anderen Ebenen vollständig umgangen, indem dort erst gar keine Fluoreszenz angeregt wird; dazu mehr in Kap. 1.2. Dreidimensionale Darstellungen des Präparats werden auch hier durch Scannen des Laserstrahls und Bewegen des Objektivs generiert. Da hier jedoch mit längeren Anregungswellenlängen gearbeitet wird und dabei andere quantenmechanischen Prinzipien wirksam werden, ist nicht jedes Fluorophor für die Zweiphotonenmikroskopie nutzbar. Die Zweiphotonenspektren vieler gängiger Fluorophore sind heutzutage untersucht [Xu96b, Xu96c, Xu96a, Alb98, Bes02, Dic03, Spi05, Dro09].

1.2. Zweiphotonenmikroskopie

1.2.1. Geschichte

Vor nun mehr als 80 Jahren von Maria Göppert-Mayer vorhergesagt [GM31], wird die Zweiphotonenabsorption von Fluorophoren heute vielseitig angewandt [Pet63, Den94, Mai99, Zip03, Dia06a, Dia06b]. Sie beruht auf dem Prinzip, dass ein Photon zur Anregung eines Moleküls durch zwei Photonen mit weniger - meist je der halben - Energie ersetzt werden kann (siehe Abb. 1.2). Die Wellenlängen λ_1 und λ_2 der beiden Photonen verhalten sich dabei zu der des Photons im Fall der Einphotonenanregung λ gemäß der Relation $\lambda = (\lambda_1^{-1} + \lambda_2^{-1})^{-1}$.

Die erste experimentelle Beobachtung der Zweiphotonenabsorption folgte erst nach der Erfindung des Lasers, der ersten monochromatischen Lichtquelle genügend hoher Intensität, in den sechziger Jahren [Mai60]. Damals konnte bei Beleuchtung eines $CaF_2 : Eu^{2+}$ -Kristalls durch einen Rubinlaser mit 694,3 nm Wellenlänge blaues Emissionslicht (425 nm) nachgewiesen werden [Kai61]. Für die weitere Entwicklung der Zweiphotonenmikroskopie leisteten das Design und die technische Umsetzung von Laserscanning-Mikroskopen einen erheblichen Beitrag [Dav71, Wil84]. Ein weiterer Meilenstein für das Zweiphotonenmikroskop auf dem Weg zu einem wissenschaftlich nutzbaren Instrument war die Erfindung des Ti:Sa-Lasers, der 1982 zum ersten Mal theoretisch beschrieben [Mou82] und kurz darauf umgesetzt wurde. Dieser modengelockte Laser liefert mit etwa 80 MHz extrem kurze Pulse in der Größenordnung von 100 fs mit Wellenlängen im nahen Infrarot, wodurch er sich für die Zweiphotonenmikroskopie als besonders geeignet herausstellt. Denn aufgrund der starken Laserpulse steht zur Anregung der Fluoreszenz genügend Leistung zur Verfügung, die mittlere Intensität ist jedoch aufgrund der Pulsung deutlich geringer. Dies schont das zu untersuchende Gewebe. Da die heutigen Laser jedoch Durchschnittsleistungen von rund einem Watt bieten, muss zusätzlich meist ein Abschwächer verwendet werden, der diese auf ein für biologische Proben verträgliches Maß herunterreguliert.

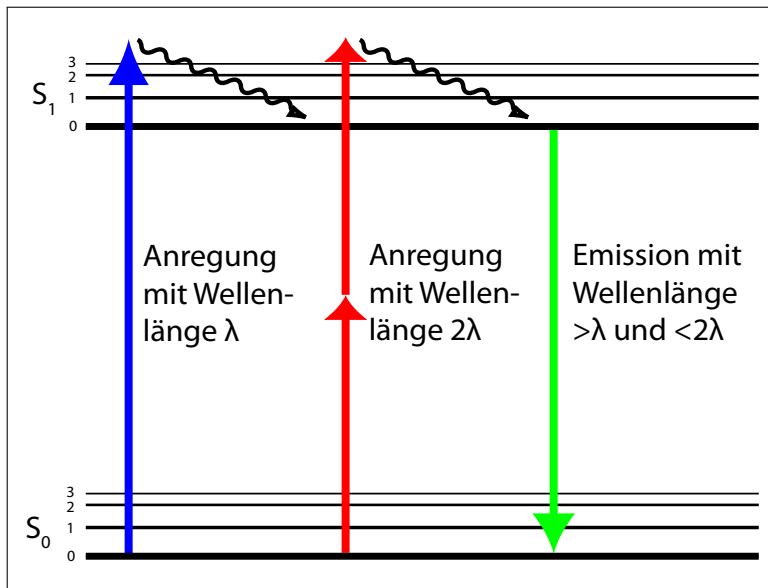


Abb. 1.2: Schema zur Anregung mit ein bzw. zwei Photonen. Die Wellenlänge der Emission ist unabhängig von der Art der Anregung.

1.2.2. Theorie

Die Wellenlänge der Emission eines Fluorophors ist unabhängig von der Art der Anregung, daher ist sie im Fall der Absorption zweier Photonen mit je halber Energie kürzer als die der Anregung. Emittierte Photonen sind also wieder höherer Streuung im Gewebe ausgesetzt. Trotzdem können sie in der Zweiphotonen-Laserscanning-Mikroskopie [Den90, Den97, Hel02, Hel05] ihrem Ursprungsort in der Probe eindeutig zugeordnet werden, da hier nur die Fluorophore, die sich direkt im Fokus des Laserstrahls befinden, überhaupt angeregt werden. Dies liegt an der Nichtlinearität der Zweiphotonenabsorption. Die Wahrscheinlichkeit w , dass ein bestimmter Fluorophor im Zentrum des Fokus *gleichzeitig* zwei Photonen absorbiert und damit die Fluoreszenzemission, hängt quadratisch von der mittleren Anregungsintensität $\langle I(t) \rangle$ des Lichts ab, die auf das Fluorophor trifft: $w \propto \langle I \rangle^2$ [Den90]. Wie oben erwähnt, eignen sich gepulste Laser mit hohen Spitzenleistungen und geringen mittleren Leistungen daher besonders. Die nötige Lichtintensität, die einen solchen Übergang wahrscheinlich genug für den effizienten Einsatz dieser Technik macht, ist nur im Fokus des Objektivs vorhanden, wo die Laserleistung auf eine kleine Fläche gebündelt wird.

Die Wahrscheinlichkeit einer Zweiphotonenanregung fällt mit der vierten Potenz des Abstands von der Fokusebene ab (dargestellt in Abb. 1.4); für einen Laserstrahl mit gaussför-

miger Intensitätsverteilung stammen 80% der gesamten Fluoreszenz aus dem Fokusvolumen, das von der e^{-2} -Iso-Intensitätsfläche begrenzt wird [Den06]. Es handelt sich dabei bei gängigen Objektiven um Volumina im Zehntel-Femtoliterbereich [San94]. Alle detektierten Photonen können also nur aus einem sehr begrenzten Gebiet der Probe stammen und eine eindeutige Zuordnung der Photonen zu ihrem Ursprungsort ist daher möglich.

Die Anzahl der Photonen N , die pro Zeit t in einem Volumen V absorbiert werden, beträgt [Xu02]:

$$N(t) = \int_V d\mathbf{r} I^2(\mathbf{r}, t) C(\mathbf{r}, t) \sigma \quad (1.1)$$

Hierbei gehen der Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitt σ des verwendeten Moleküls und die Konzentration $C(\mathbf{r}, t)$ des Farbstoffs mit ein. Letztere kann als konstant betrachtet werden, wenn sie so hoch ist, dass sie sich bei Bleichung und bei Anregung einiger Moleküle nur vernachlässigbar ändert, d.h. wenn zu jedem Zeitpunkt noch genügend Moleküle in nicht angeregtem Zustand zur Verfügung stehen. Da die Intensität aufgrund der Pulsung sowohl zeitabhängig ist, als auch aufgrund der Optik in der Probe ortsabhängig, kann man diese folgendermaßen umschreiben:

$$I(\mathbf{r}, t) = I_0(t) S(\mathbf{r}) \quad (1.2)$$

Damit erhält man für die Anzahl der Photonen:

$$N(t) = I_0^2(t) C \sigma \int_V d\mathbf{r} S^2(\mathbf{r}) \quad (1.3)$$

Als experimentelle Größe steht allerdings nur die mittlere Intensität des Lasers zur Verfügung. Gleichung 1.3 muss also wie folgt umformuliert werden:

$$\langle N(t) \rangle = \langle I_0^2(t) \rangle C \sigma \int_V d\mathbf{r} S^2(\mathbf{r}) \quad (1.4)$$

Doch auch das Mittel des Quadrats der Intensität ist eine experimentell schwer zugängliche Größe. Daher wird der Faktor $g = \frac{\langle I_0^2(t) \rangle}{\langle I_0(t) \rangle^2}$ eingeführt, ein Maß für die zeitliche Kohärenz

zweiter Ordnung der Lichtquelle [Xu96a].

$$\langle N(t) \rangle = g \langle I_0(t) \rangle^2 C \sigma \int_V d\mathbf{r} S^2(\mathbf{r}) \quad (1.5)$$

Meist wird in den experimentellen Aufbauten der Strahldurchmesser so weit vergrößert, dass er die Rückapertur des Objektivs leicht überfüllt. Es kann also von beugungslimitierter Optik ausgegangen werden. In diesem Falle können die Eigenschaften der Linse durch ihre Punktspreizfunktion (PSF) beschrieben werden. Unter Verwendung der paraxialen Näherung, die die meisten optischen Systeme genügend genau beschreibt, jedoch nur für sehr kleine numerische Aperturen exakte Ergebnisse liefert, ergibt sich [Xu02]

$$I_0(t) = \frac{\pi (NA)^2 P(t)}{\lambda^2} \quad (1.6)$$

und für das Integral aus Gleichung 1.5

$$\int_V d\mathbf{r} S^2(\mathbf{r}) = 70 \left[\frac{n_0 \lambda^3}{8\pi^3 (NA)^4} \right], \quad (1.7)$$

wobei n_0 der Brechungsindex der Probe ist und NA für die numerische Apertur des Objektivs steht. Natürlich gilt dies nur, wenn sich das gesamte Fokusvolumen auch innerhalb der Probe befindet, d.h. nur für genügend dicke Präparate, von denen aber in den allermeisten Fällen ausgegangen werden kann.

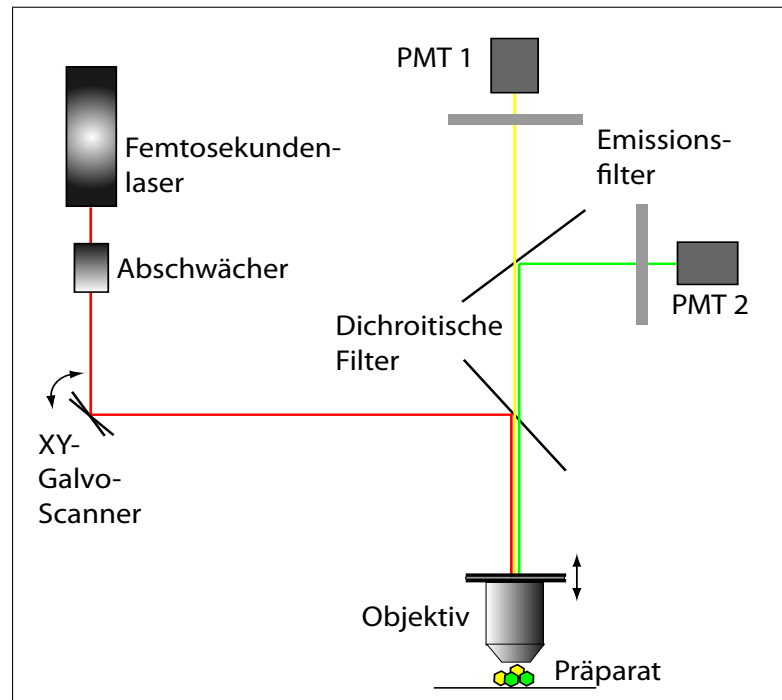
Eingesetzt in Gleichung 1.5 folgt daraus [Xu96a]:

$$\langle N(t) \rangle = g C \sigma \left[\frac{8.75 n_0 \langle P(t) \rangle^2}{\lambda \pi} \right] \quad (1.8)$$

Man beachte, dass die Anzahl der absorbierten Photonen weder von der numerischen Apertur des Objektivs noch vom Fokusvolumen abhängt. Eine erhöhte Intensität durch eine größere numerische Apertur wird direkt durch ein kleineres Fokusvolumen kompensiert. Damit ist auch die Anzahl der Fluoreszenzphotonen unabhängig von der Größe des Anregungsvolumens [Xu02].

Eigenschaften der Zweiphotonenmikroskopie bezüglich Auflösung und Punktspreizfunktion

Abb. 1.3: Aufbau eines typischen Zweiphotonenmikroskops mit zwei Emissionskanälen. Die Fluoreszenz wird hier durch einen modengelockten Femtosekundenlaser angeregt. Oft kann man dessen Wellenlänge passend zum Fluorophor verändern. Das Laserlicht wird in lateraler Richtung durch zwei Galvoscanner bewegt, das Objektiv ist in axialer Richtung verschiebbar. Das Emissionslicht wird Punkt für Punkt durch je einen Photomultiplier (PMT) pro Kanal detektiert.



werden in Kap. 2.2 beschrieben.

1.2.3. Anwendung der Zweiphotonenmikroskopie

Der Aufbau eines typischen Zweiphotonenmikroskops ist in Abb. 1.3 dargestellt. Die Wellenlänge des Femtosekundenlasers wird auf das Maximum des Absorptionsspektrums des jeweiligen Fluorophors abgestimmt und die Leistung gegebenenfalls abgeschwächt. Um nun zweidimensionale Bilder zu generieren, wird der Laserstrahl in beiden lateralen Richtungen über die Probe gescannt. Für dreidimensionale Aufnahmen wird ein solches Bild durch Bewegung des Objektivs in axialer Richtung in verschiedenen Ebenen aufgenommen. Das Emissionslicht wird durch einen dichroitischen Filter vom Anregungslicht des Lasers getrennt. Um verschiedene Strukturen farblich unterscheiden zu können, wird häufig mit zwei Farbkanälen gearbeitet, die ebenfalls durch einen Dichroiten getrennt werden. Detektiert werden die Photonen Punkt für Punkt durch Photomultiplier.

Aufgrund ihrer speziellen Eigenschaften und der Überlegenheit gegenüber Einphotonentechniken in stark streuendem Gewebe und dicken Präparaten findet die Zweiphotonenmi-

kroskopie heute vielfach Anwendung in den verschiedensten Gebieten der Biologie [Dun00, Ohe01, Hel05, O'M08]. Besonders hervorzuheben sind in-vivo Anwendungen, bei denen man auf die hohe Eindringtiefe der Zweiphotonenmikroskopie angewiesen ist, und Kalziumreaktionen in stark streuendem Gehirngewebe.

Das Mikroskopieren in lebenden Tieren macht es möglich, bestimmte Strukturen über einen gewissen Zeitraum hinweg wiederholt zu beobachten („chronisches Imagen“) und dabei deren Veränderungen zu verfolgen. So wurde beispielsweise das Wachstum bzw. das Verschwinden von dendritischen Dornfortsätzen (engl. Spines) als Reaktion auf hormonelle Veränderungen, sensorische Überstimulation oder aufgrund bestimmter Erfahrungen und Lernvorgänge des Tiers beobachtet [Svo97, Len00, Tra02]. Großen Einfluss hatte diese Methode insbesondere auch auf die Alzheimer-Forschung, wo der Effekt verschiedener Faktoren auf die Pathologie in transgenen Mausmodellen direkt beobachtet werden kann [Bac01, Fuh10, SJ11]. Mit der Entwicklung einer Methode im Bereich der chronischen Mikroskopie zur Alzheimer-Forschung beschäftigt sich Kap. 3.

1.2.4. Zweiphotonenmikroskopie und Dreidimensionalität

Bei Einphotonentechniken ist die Wahrscheinlichkeit für eine Anregung linear proportional zur Intensität des Laserlichts, also der Leistung pro Fläche. Sie ist daher konstant für jede zur Fokusebene parallele Fläche innerhalb der Probe (wie in Abb. 1.4 dargestellt). Je kleiner der Abstand zur Fokusebene, desto höher wird die Leistung pro Fläche, da das Anregungslicht immer stärker fokussiert wird. Gleichzeitig werden dieser erhöhten Intensität aber weniger Moleküle ausgesetzt, so dass die gesamte Fluoreszenz pro Fläche konstant ist. Fluoreszenzlicht stammt also aus dem gesamten dreidimensionalen Doppelkegel, durch den das Licht im Präparat propagiert. Dies bedeutet, dass auch in Ebenen außerhalb des Fokus während des gesamten Mikroskopiervorgangs Bleichung des Gewebes stattfindet [Den90].

Aufgrund der quadratischen Abhängigkeit der Anregungswahrscheinlichkeit von der mittleren Laserleistung ist die Fluoreszenzemission und auch die Bleichung im Zweiphotonenfall jedoch auf den Fokuspunkt reduziert. Das Präparat wird so minimal-invasiv optisch geschnit-

ten, wodurch dreidimensionale Darstellungen der Probe möglich werden.

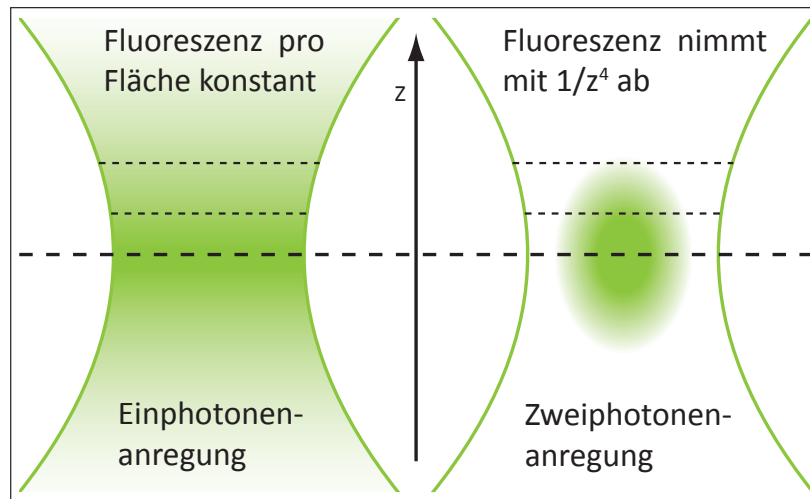


Abb. 1.4.: Abhängigkeit der Fluoreszenz vom axialen Abstand zum Fokus. Im Einphotonenfall ist die Fluoreszenzleistung pro Fläche nicht abhängig vom Abstand zum Fokus. Aufgrund der nicht-linearen Anregung im Zweiphotonenfall ist die Fluoreszenz auf das Fokusbereich im Zentrum des Laserstrahls beschränkt. Die Leistung der Fluoreszenz fällt mit $1/z^4$ ab, wobei z die axiale Distanz vom Fokus ist.

1.3. Zielsetzung

Durch die intrinsische Konfokalität der Zweiphotonenmikroskopie bieten sich bestimmte Anwendungen in Proben an, die sich nicht nur auf zwei Dimensionen beschränken und über die Möglichkeiten vieler kommerziell verfügbarer Instrumente hinausgehen. Ziel war es, für zwei spezielle biologische Anwendungen je eine Methode zu entwickeln und sie an deren Anforderungen individuell anzupassen.

Hierfür wurde zum einen ein Sechssachsentisch in ein Zweiphotonenmikroskop implementiert, der eine stets reproduzierbare, dreidimensionale Ausrichtung eines Versuchstiers für wiederholte in-vivo Aufnahmen ermöglichen sollte (Kap. 3). Zum anderen sollte ein Scanmodus entwickelt werden, der eine Beobachtung schneller Reaktionen in dreidimensionalen Strukturen mit hoher zeitlicher Auflösung ermöglicht. Dies sollte mit einer Magnetspule als z -Trieb, die sich durch einen besonders großen Hub auszeichnet, realisiert werden (Kap. 4).

Beide Methoden sollten evaluiert und ihre Durchführung am lebenden Tier bzw. an Hirn-

schnitten, demonstriert werden. Hierfür standen im ersten Fall mit einem Schädelfenster ausgestattete Mäuse mit Alzheimer-Pathologie zu Verfügung; für den hochfrequenten Scan wurden akute Gehirnschnitte aus Wüstenrennmäusen verwendet.

2. Versuchsaufbau

2.1. Experimenteller Aufbau des verwendeten Zweiphotonenmikroskops

Für den Aufbau diente als Grundgerüst ein Prototyp des Intravital-Mikroskops (TILL Photonics, Gräfelfing, Deutschland), basierend auf einem schwingungsarmen Mineralguss. Für die Fluoreszenzanregung wurde ein Ti:Sapphire Laser (Mai Tai HP, Wellenlängen 690 - 1020 nm, Spectra-Physics, Darmstadt, Deutschland) benutzt. In x- und y-Richtung wird der Fokus durch eine digital gesteuerte Scaneinheit bewegt (Yanus, TILL Photonics). Durch die telezentrische Optik des Yanus (Abb. 2.1), die einen Scanspiegel in den anderen abbildet, ist der Laserstrahl auf beiden Spiegeln stationär. Dadurch können sehr kleine Scanspiegel verwendet werden, die eine hohe Geschwindigkeit beider Achsen erlauben. Zusätzlich ist der Laserstrahl auch in der Rückapertur des Objektivs stationär.

Anregungs- und Emissionsstrahlengang werden durch dichroitische Spiegel getrennt. Zusätzlich kann durch einen Klappspiegel von Weitfeld- auf Zweiphotonenmikroskopie umgestellt

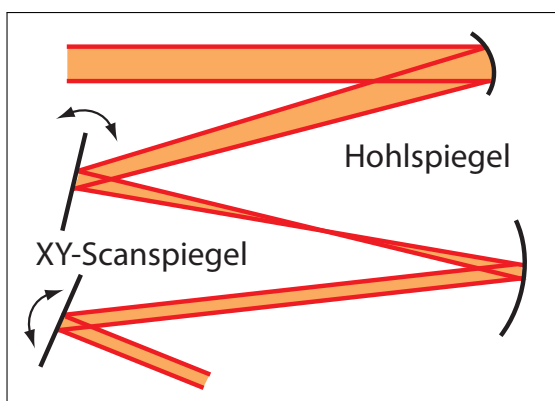
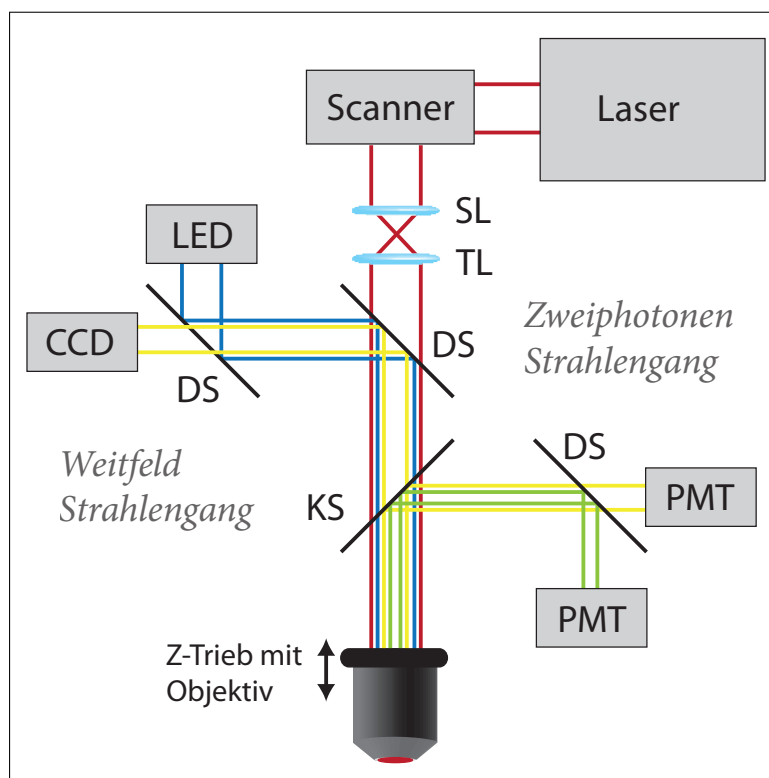


Abb. 2.1: Yanus Scaneinheit mit telezentrischer Optik, die einen Scanspiegel auf den anderen abbildet. Durch den stationären Laserstrahl auf beiden Spiegeln werden hohe Scangeschwindigkeiten erreicht.

Abb. 2.2: Schematische Darstellung des verwendeten Zweiphotonenmikroskops.

Um ein Objektiv mit unendlicher Bildweite verwenden zu können, befinden sich vor dem Objektiv die Scanlinse (SL) und die Tubuslinse (TL). Die Trennung der Anregungs- bzw. Emissionsstrahlengänge erfolgt durch dichroitische Spiegel (DS), die Umstellung von Weitfeld- auf Zweiphotonenmodus durch einen Klappspiegel (KS). Das Signal wird durch eine CCD-Kamera bzw. durch Photomultiplier Tubes (PMTs) detektiert.



werden. Die Beleuchtung im Weitfeldmodus erfolgt durch eine LED, die Bildgebung durch eine CCD-Kamera. Die zwei Emissionsfarbkanäle werden ebenfalls durch dichroitische Spiegel getrennt. Das System ist mit 2 GaAsP-Detektoren (H7422P-40 modifiziert für größere Eingangswinkel an der Photokathode, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)¹ ausgestattet, die das Emissionslicht verlustarm in kurzem Abstand zum Objektiv auf sammeln.

Das System wird über die frei-verfügbare Software Colibri [See13] gesteuert, die in der Programmierungsumgebung LabVIEW (National Instruments, Austin, Texas, USA) entwickelt wurde. Diese ermöglicht eine einfache Implementierung von zusätzlicher Hard- und Software.

¹nur bei den Experimenten an Spinalganglien des Haushuhns wurde zur Detektion des Zweiphotonensignals je ein Avalanche-Photodioden-Array (MPPC S10362-11-100P, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) in Kombination mit einem am BioImaging Zentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München entwickelten Verstärker (Diplomarbeit von Andreas Lechner) benutzt

Besonderheiten des Aufbaus zur 3D Ausrichtung der Probe

Für die in Kap. 3 beschriebene Methode, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde, wird das Versuchstier auf einem Hexapod befestigt (M-810, Physik Instrumente, Karlsruhe, Deutschland), der sowohl Translation als auch Rotation der Probe ermöglicht. Es wurde ein 20x-Wasserimmersionsobjektiv (Zeiss, Jena, Deutschland) mit einer numerischen Apertur von 1,0 benutzt. Dieses wurde zum Fokussieren mit einem Piezoaktuator (PIFOC, Physik Instrumente, Karlsruhe, Deutschland) mit insgesamt 400 μm Stellweg bewegt. Zur Bildgebung im Weitfeldmodus wurde eine CCD-Kamera (Pike F-145, Allied Vision Technologies, Stadtra, Deutschland) eingesetzt.

Um für die in-vivo Mikroskopie eine möglichst hohe Eindringtiefe zu erreichen, wurde der Mai Tai Laser durch eine Einheit ergänzt, die den Puls vorkomprimiert (DeepSee, Spectra-Physics, Darmstadt, Deutschland). Die Dispersion im Strahlengang und die damit einhergehende Streckung des Pulses soll damit ausgeglichen werden. Die Pulslänge ist auf 130 fs in der Objektebene spezifiziert.

Besonderheiten des Aufbaus für die Trajektorienscans

Die in Kap. 4 beschriebene Methode ist auf schnelle und präzise dreidimensionale Scanbewegungen angewiesen. Diese wurden in axialer Richtung mit einer magnetischen Schwingspule ausgeführt (siehe Kap. 4.2.1), an der ein 25x-Wasserimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von 1,1 (Nikon, Tokio, Japan) befestigt ist. Die Schwingspule verfügt über einen Verfahrweg von 9,9 mm und eine Genauigkeit im Nanometerbereich. Weitfeldbilder wurden mit der Sensicam QE CCD-Kamera (PCO AG, Kehlheim, Deutschland) gemacht.

Da hier nicht im lebenden Tier (und zunächst ohne Fluoreszenz), sondern in dünnen Zellpräparaten gearbeitet wurde, wurde für den Weitfeldmodus eine Beleuchtung mit Intensitätsgradient nach Dodt konstruiert, um den Kontrast im Bild zu erhöhen [Dod13]. Hierbei wird ein räumlicher Filter in den Strahlengang gesetzt, der nur ein Viertel eines Kreissegments freigibt (Abb. 2.3). Durch einen Diffusor wird anschließend ein Beleuchtungsgradient erzeugt. Während der Kontrast erhöht wird, wird die Streuung des Lichts in der Probe reduziert und

ungefärbte Zellpräparate werden sichtbar. Über einen Spiegel wird die Probe im Durchlicht von unten durch einen Kondensor mit einer numerischen Apertur von 1,0 beleuchtet.

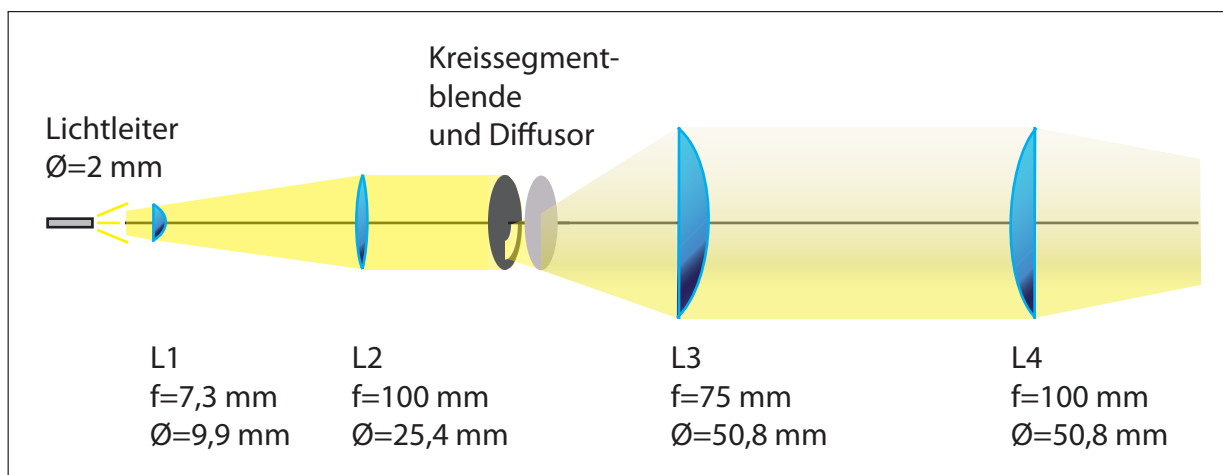


Abb. 2.3.: Schema der Beleuchtung mit Intensitätsgradient. Das Ende des Lichtleiters mit 2 mm Durchmesser, in den sichtbares oder infrarotes Licht einer LED eingekoppelt wurde, wird durch die Linsen L1 bis L4 vergrößert in die Aperturblende des Kondensors (nicht eingezeichnet) abgebildet. Der Beleuchtungsgradient für einen erhöhten Kontrast wird durch einen räumlichen Filter, der Licht nur in etwa einem Viertel eines Kreissegments durchlässt, und einen Diffusor erzeugt.

2.2. Punktspreizfunktion des Systems

Um den Messaufbau zu charakterisieren, wird grundsätzlich zunächst die Punktspreizfunktion (PSF) des bildgebenden Systems gemessen. Die PSF eines bildgebenden Systems beschreibt den Zusammenhang zwischen der tatsächlichen Struktur der Probe und deren Bild. Mathematisch spricht man hierbei von einer Faltung eines Punktes in der Probe mit der PSF des Systems. Der Punkt geht hierbei in ein unscharfes Bild des Punktes über. Das endgültige Bild der Struktur ist die Summe aller unscharfen Bilder ihrer Punkte, skaliert mit den jeweiligen Helligkeiten der Punkte [Sha06].

Ab einer gewissen Tiefe in stark streuenden Proben [Don03] oder bei Brechungsindexsprüngen im Strahlengang bzw. in der Probe [dG99] verschlechtert sich die PSF, und das Auflösungsvermögen des bildgebenden Systems lässt nach. In den folgenden Versuchen im Rahmen dieser Arbeit soll der Messwert der PSF jedoch nur als Richtwert verstanden werden

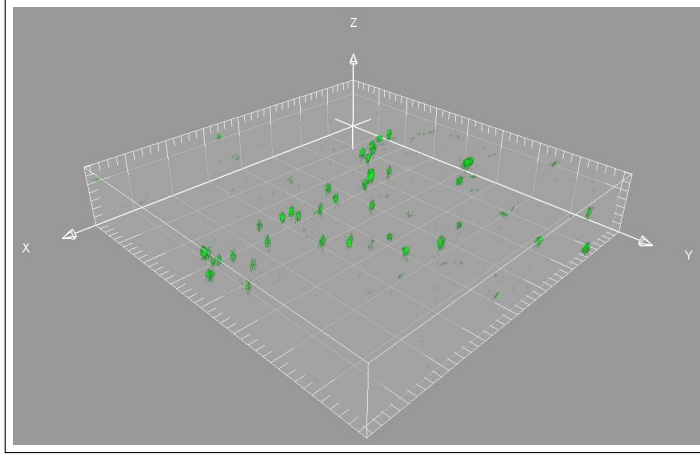


Abb. 2.4.: Bilderstapel zur Messung der PSF an grün fluoreszierenden Mikrokügelchen mit einem Durchmesser von 170 nm. Die Anregungswellenlänge beträgt 990 nm. Der Bilderstapel wurde an dem Aufbau für die Trajektorienscans (Kap. 4) aufgenommen.

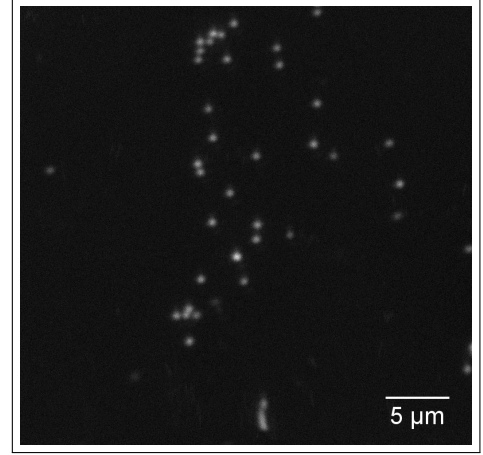


Abb. 2.5.: Z-Projektion (gemittelte Intensität) des Bilderstapels aus Abb. 2.4

und wird innerhalb der Probe als konstant angenommen. Zudem wird sie für die beiden experimentellen Aufbauten (Kap. 3 und Kap. 4) jeweils nur für eine Wellenlänge gemessen. Die laterale und axiale Auflösung (δ_{xy} bzw. δ_z) eines Zweiphotonenmikroskops ändert sich jedoch nur linear mit der Wellenlänge. Eine Größenabschätzung der oberen Grenze der Auflösung, also der radialen und axialen Distanz bis zum ersten Intensitätsminimum, liefert [Tsa02]:

$$\delta_{xy} = 0.6 \frac{\lambda_0}{n} \left(\frac{n}{NA} \right) \quad (2.1)$$

$$\delta_z = 2 \frac{\lambda_0}{n} \left(\frac{n}{NA} \right)^2 \quad (2.2)$$

Zur Messung der PSF wird eine Punktlichtquelle im Präparat benötigt, technisch näherungsweise realisierbar durch Quantum Dots (siehe auch Kap. 1.1.1) oder fluoreszente Mikrokügelchen mit einem Durchmesser kleiner als die Auflösung des Systems [Can06]. Zu diesem Zweck wurde ein Agarosegel (1% Agarose in H_2O) hergestellt, in das fluoreszente Mikrokügelchen (Molecular Probes, Eugene, Oregon) mit einem Durchmesser von 170 nm gemischt waren, siehe Abb. 2.4. Die Probe war entsprechend der Korrektur des Objektivs mit einem Deckglas der Dicke $d = 170 \mu\text{m}$ abgeschlossen.

2. Versuchsaufbau

Für den Aufbau zur dreidimensionalen Ausrichtung der Probe (Kap. 3) ergibt sich hierdurch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 880$ nm in lateraler Richtung eine PSF mit einer Halbwertsbreite von 404 nm; in axialer Richtung wurden 1201 nm gemessen. Dies ist konsistent mit den durch Gl. 2.1 und 2.2 vorhergesagten Werten für den ungünstigsten Fall von $\delta_{xy} = 528$ nm und $\delta_z = 2341$ nm.

Für den Aufbau für die Trajektorienscans (Kap. 4) wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 990$ nm in lateraler Richtung eine PSF mit einer Halbwertsbreite von 489 nm gemessen; in axialer Richtung ergab die Messung 1114 nm. Auch dies ist konsistent mit den durch Gl. 2.1 und 2.2 vorhergesagten Werten für den ungünstigsten Fall von hier $\delta_{xy} = 540$ nm und $\delta_z = 2176$ nm. Die PSF-Einzelmessungen von 17 verschiedenen Mikrokügelchen aus Abb. 2.4 sind in Anhang A aufgelistet.

3. Ausrichtung der Probe für reproduzierbare, chronische in-vivo Aufnahmen

Die Zweiphotonenmikroskopie ist die Methode der Wahl, wenn es um Aufnahmen in stark streuenden Proben, wie etwa Gehirngewebe, geht [Den95, Yus95, Den96, Sab00]. Besonders Untersuchungen in lebenden Tieren, wo offenkundig keine dünnen Gewebeschnitte zur Verfügung stehen, erfordern hohe Eindringtiefen, wie sie die Zweiphotonenmikroskopie durch die Verwendung von Wellenlängen im nahinfraroten Teil des Spektrums bietet [Hel99, Svo99, Sto03, Ohk06, Hof09]. Insbesondere in der Alzheimer-Forschung an transgenen Mäusen wird die Technik gehäuft eingesetzt (siehe Kap. 3.1). Hier werden über einen Zeitraum von Wochen oder Monaten Aufnahmen von Gehirnarealen gemacht, um dort krankheitsbedingte Veränderungen festzustellen [Chr99, Chr01, SJ11]. Diese Art von chronischer Mikroskopie wird realisiert, indem der Schädel der Maus geöffnet und ein Glasfenster mit einem Durchmesser von ca. 3 mm eingesetzt wird. So können Veränderungen der Neurone, ihrer Dendriten oder sogar der postsynaptischen Dornfortsätze beobachtet werden. Kombiniert mit den Möglichkeiten der Gentechnik hinsichtlich der Expression von fluoreszierenden Proteinen in Zellen [Sha05, Dav09] stehen dem Neurowissenschaftler damit höchst effektive Werkzeuge zur Verfügung.

Um die bei neurodegenerativen Erkrankungen auftretenden Veränderungen im Gehirn des Tiers quantifizieren zu können, ist zusätzlich eine hohe optische Auflösung nötig [Mis06, Svo06] sowie die Möglichkeit, die zu untersuchende Region im Gehirn wiederholt unter gleichen Bedingungen darzustellen. Nur so sind aussagekräftige Bewertungen der Bildstapel ver-

3. Ausrichtung der Probe für reproduzierbare, chronische in-vivo Aufnahmen

schiedener Zeitpunkte und deren Vergleich möglich. Für die chronische Mikroskopie wird das Versuchstier daher in einer eigens dafür entwickelten Vorrichtung unter dem Objektiv platziert. Diese sorgt dafür, dass Bewegungsartefakte reduziert bzw. ausgeschlossen werden können. Bisher ist über die meist selbst gebastelten Halterungen wenig bekannt. Publikationen berichten von Stangen, die das Tier beidseitig im Bereich der Ohren fixieren [Sko05], Titanbalken, die neben dem kranialen Fenster festgeklebt werden [Hol09] oder einfach nur von „eigens angefertigten“ Halterungen. All diese Methoden sind jedoch mit einem konventionellen Mikroskoptisch kombiniert und erlauben daher nur eine begrenzt reproduzierbare Ausrichtung der Probe. Abweichungen der Position und des Winkels der Probe unter dem Objektiv an unterschiedlichen Tagen der Messreihe können jedoch dazu führen, dass Strukturen aus leicht verändertem Blickwinkel betrachtet werden und sich daher scheinbar in ihrer Form unterscheiden. Für verlässliche Aussagen zur Veränderung der untersuchten Struktur ist es daher sinnvoll, das Volumen zu Beginn jeder Aufnahme gleich auszurichten.

Statt eines gewöhnlichen Mikroskoptisches, der nur die Translation in lateraler und axialer Richtung ermöglicht, wurde daher ein Sechssachsentsch (sog. *Hexapod* von Physik Instrumente, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt, der zusätzlich Rotationen um alle drei Bewegungsachsen erlaubt. Der Hexapod wurde in ein aufrechtes Zweiphotonenmikroskop (Intravital, TILL Photonics, Gräfelfing, Deutschland) implementiert (siehe Kap. 3.2). Er wird durch eine eigens hierfür geschriebene Software gesteuert, die in die open-source Software des Mikroskops (Colibri [See13]) integriert wurde. Die Oberfläche des kranialen Fensters der zu untersuchenden Maus kann damit - basierend auf Referenzpunkten auf der Glasoberfläche - vor jeder mikroskopischen Untersuchung exakt senkrecht zum Laserstrahl ausgerichtet werden. Dieser Versuchsaufbau ermöglicht folglich wiederholte Aufnahmen eines Hirnareals unter stets gleichen Winkeln und verbessert damit die Bedingungen für chronische in-vivo Studien (siehe Kap. 3.3).

3.1. Motivation: Die Erforschung von Morbus Alzheimer an transgenen Mäusen

1907 von Alois Alzheimer beschrieben [Alz07], ist die nach ihm benannte Krankheit heute ein wichtiges Forschungsgebiet. Der größte Risikofaktor, an dieser Form der Demenz zu erkranken, ist das Alter. Nicht zuletzt aufgrund verbesserter medizinischer Versorgung und der damit einhergehenden demografischen Veränderung hin zu einer älteren Gesellschaft steigt die Zahl der Betroffenen [Cum02].

Makroskopische Symptome umfassen den Verlust von Nervenzellen und damit die Abnahme des Gehirnvolumens, was sich in einer verminderten Gedächtnisleistung [Mor86] und Orientierungsfähigkeit [Mor97] äußert. In einem späteren Stadium kommen Persönlichkeitsveränderungen [RJ00] und ein Verlust der Sprache hinzu [Mur87]. Als zugrundeliegende mikroskopische Ursachen gelten Amyloid-beta(A β)-Proteinablagerungen im Gehirn und die Bildung von neurofibrillären Tangles (NFTs) aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein innerhalb der Nervenzellen [SJ11]. Infolgedessen kommt es außerdem zum für neurodegenerative Krankheiten typischen Synapsenverlust [Sch03].

Die Erforschung der Alzheimerschen Krankheit am lebenden Patienten ist nur eingeschränkt möglich. Zum einen kann die Krankheit oftmals erst post mortem mit ausreichender Sicherheit diagnostiziert werden, zum anderen ist die Analyse von Hirngewebe aus lebenden Menschen aus ethischen Gründen problematisch. Neurowissenschaftler erweitern ihre Möglichkeiten daher mit der Arbeit an Tiermodellen. Neben der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* wird bei der Erforschung des Morbus Alzheimer vornehmlich mit Mäusen gearbeitet [Gö8]. Diese Tiere bieten den Vorteil kurzer Generationszyklen, verhältnismäßig einfacher Haltung und Zucht und - im Fall der Maus - großer Ähnlichkeit des Genoms zu dem des Menschen. Es stehen heute eine Vielzahl von transgenen Mauslinien zur Verfügung, die pathogene Mutationen von humanen Genen exprimieren [Wen92, Fra08, Alz13]. Direkte Einsicht in Vorgänge im lebenden Organismus gibt die in-vivo Mikroskopie im Mausmodell (siehe Kap. 3.2). Wie einleitend erwähnt, ist es hier-

bei entscheidend, verlässliche Aussagen über auftretende Veränderungen treffen zu können. Die entwickelte Methode zur dreidimensionalen Ausrichtung des Versuchstiers soll im Folgenden beschrieben werden.

3.2. Materialien und Methoden

Operation der Maus

Das Glasfenster für die chronische Mikroskopie, das ein etwa 12 mm² großes Stück Schädelknochen ersetzt, wird einem etablierten Protokoll gemäß eingesetzt [Hol09]. Hierfür wird direkt vor dem Eingriff Dexamethason verabreicht (4 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal), um Entzündungen vorzubeugen. Das Tier wird anschließend mit Ketamin und Xylazin (130 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 10 mg/kg Körpergewicht Xylazin intraperitoneal) anästhesiert. Die Haut über dem gewünschten Hirnareal wird entfernt, bevor mit einem Zahnarztbohrer (Schick-Technikmaster C1; Pluradent; Offenbach, Deutschland) vorsichtig ein Loch in den Knochen gebohrt wird. Ein rundes Deckglas mit einem Durchmesser von 5 mm wird dann auf die Öffnung gelegt und mit einer Acrylfarbe (Cyano-Veneer fast; Heinrich Schein Dental Depot, München, Deutschland) mit nur wenig Druck am Knochen festgeklebt. Neben dem Fenster wird ein Metallstück festgeklebt, an dem das Tier für die Versuchsreihe auf dem Mikroskoptisch befestigt werden kann. Nach der Operation wird der Maus über einen Zeitraum von drei Tagen subkutan Carprofen (5 mg/kg Körpergewicht Rimadyl; Pfizer, New York, USA) verabreicht, um die Schmerzen zu unterdrücken. Die Tiere werden nach dem Einsatz eines kranialen Fensters einzeln gehalten. Alle experimentellen Arbeitsschritte wurden in Übereinstimmung mit einem durch die Ludwig-Maximilians-Universität München und die Regierung von Oberbayern genehmigten Tierversuchsprotokoll durchgeführt (Referenznummer 55.2-1.54-2531-110-06).

Es wurde jedoch für die Demonstration des hier entwickelten Verfahrens zur dreidimensionalen Ausrichtung der Maus kein eigenes Tier operiert. Vielmehr wurde eine Maus benutzt, die zuvor in ein anderes Experiment unseres Labors eingebunden war. Es handelte sich um

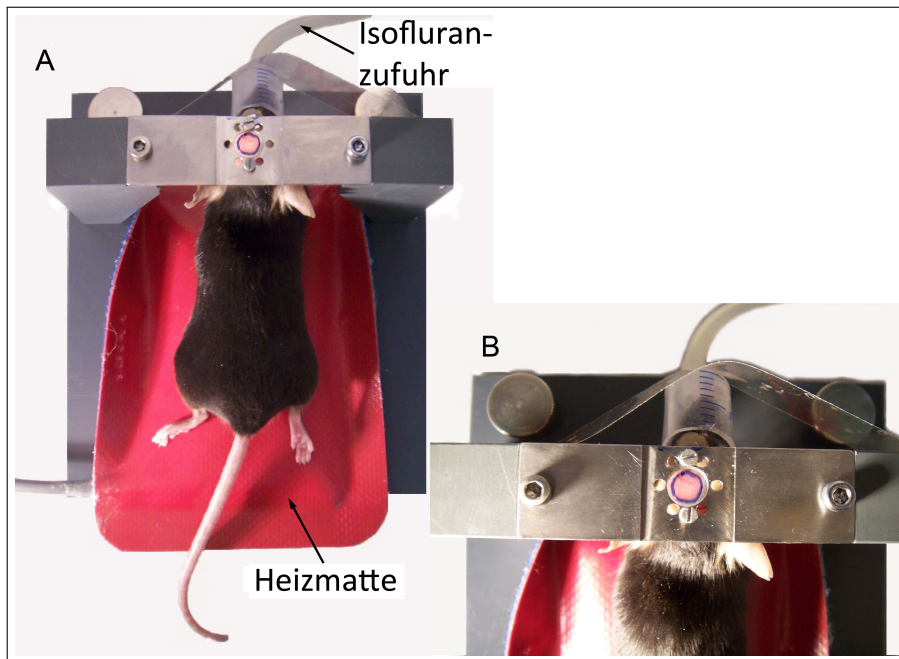


Abb. 3.1: Maushalterung (aus [Sch11]). Die Maus wird auf einer Heizmatte platziert und mit zwei Schrauben an der Halterung befestigt (A). Isofluran wird verabreicht. Der Rand des Glasfensters wird mit wasserfestem Stift markiert, um den Kontrast im Weitfeld-Bild unter dem Mikroskop zu erhöhen (B).

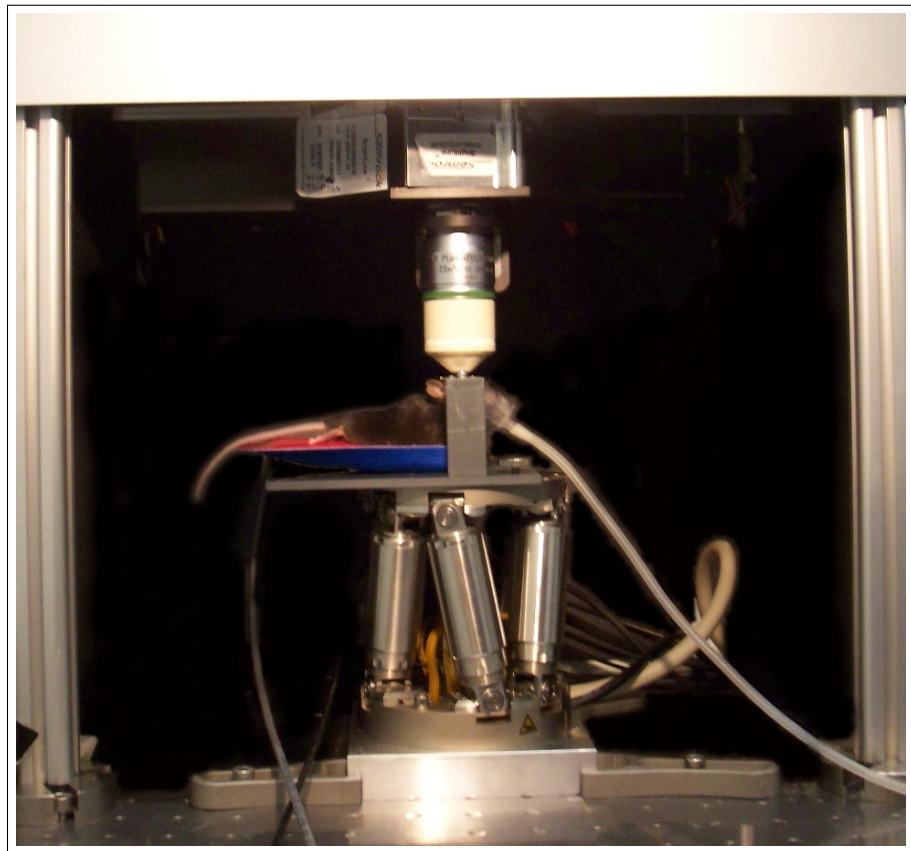
einen Nachkommen einer heterozygoten APPPS1 doppelt transgenen Maus [Rad06], gekreuzt mit einer YFP-H heterozygoten Maus zur Visualisierung einzelner Neurone [Fen00] (B6.Cg-Tg(Thy1-YFPH)2Jrs/J, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA). Aufgrund der rein methodischen Natur des vorliegenden Versuchs ist der pathologische Hintergrund des Tiers jedoch irrelevant.

Eine für einen Versuch vorbereitete Maus auf der Halterung, die auf dem Sechssachsentisch (Hexapod) unter dem Objektiv des Mikroskops befestigt wird, ist in Abb. 3.1 zu sehen.

Chronische Mikroskopie durch das kraniale Fenster

Während der mikroskopischen Untersuchung wird die Maus über ein Mundstück mit Isofluran anästhesiert (etwa 1% in reinem Sauerstoff), siehe Abb. 3.1. Um Unterkühlung vorzubeugen, wird sie auf eine Heizmatte gelegt. Die Augen werden mit Bepanthen-Salbe (Bayer, Leverkusen, Deutschland) abgedeckt, damit sie nicht austrocknen. Zusätzlich muss das Glasfenster mit einem Skalpell durch vorsichtiges Kratzen von Ablagerungen befreit werden, damit die Sicht durch das Fenster nicht getrübt ist. In Abb. 3.2 ist der Laboraufbau des Mikroskops zusammen mit dem Hexapod und der darauf befindlichen Maus zu sehen. Der Strahlengang des

Abb. 3.2: **La-**
boransicht des
Versuchstiers auf
dem Hexapod unter
dem Mikroskop (aus
[Sch11]).



Mikroskops ist in Abb. 2.2 dargestellt und in Kap. 2.1 detailliert beschrieben.

Um in der Vergangenheit bereits betrachtete Hirnregionen wiederzufinden, wird die Gefäßlandschaft im Weitfeld-Modus zur Orientierung genutzt [Gru02], bevor man in den Zweiphotonen-Modus wechselt.

Das gelb fluoreszierende Protein YFP wurde bei $\lambda = 880$ nm mit dem Ti:Sapphire Laser (Mai Tai HP DeepSee, Wellenlängen 690–1020 nm, Spectra-Physics, Darmstadt, Deutschland) angeregt. Das gesamte Fluoreszenzlicht mit Wellenlängen $\lambda \geq 550$ nm wurde aufgesammelt. Die Lichtleistung des Lasers am Ort der Probe wurde bei $P < 50$ mW gehalten, um die Phototoxizität auf ein Minimum zu beschränken.

Winkelberechnung und Rotation

Die Maus wird mit Isofluran anästhesiert und auf ihrer Halterung platziert. Nach der Reinigung des kranialen Glasfensters von Ablagerungen wird dessen Rand mit einem wasserfes-

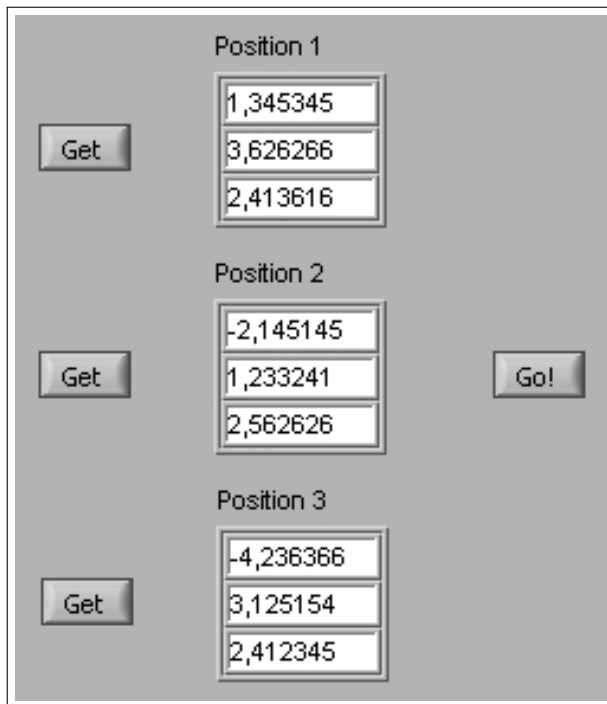


Abb. 3.3: Benutzeroberfläche des Programms zur Ausrichtung der Probe. Mit der Taste „Get“ werden die drei Koordinaten des Hexapods und die z-Position des Piezofokus - jeweils für drei Punkte - ausgelesen. Hierbei wird die x-Position des Hexapod in das oberste Anzeigefeld geschrieben, die y-Position ins zweite, und die Summe der z-Positionen von Hexapod und Piezofokus ins dritte. Durch Mausklick auf die Taste „Go!“ werden die Rotationswinkel berechnet und die Parameter an den Treiber des Hexapods übergeben. Der Rotationsmechanismus wird daraufhin gestartet.

ten Stift markiert (siehe Abb. 3.1). Die Glasoberfläche erhält so einen höheren Kontrast im Weitfeld-Bild. Die Halterung mit der Maus wird nun auf dem Hexapod unter dem Objektiv festgeschraubt.

Es müssen nun die Fokuspositionen von drei verschiedenen Punkten P_1 , P_2 und P_3 auf dem markierten Rand bestimmt werden. Hierzu wird im Weitfeld-Modus zunächst manuell auf eine Stelle auf dem Glasrand fokussiert. Aufgrund der Schräge des Bildes ist jeweils nur ein Teil des Sichtfeldes scharf (siehe Anh. B). Nützlich sind hier kleine Luftblasen oder Kratzer in der Markierung, anhand derer die Oberfläche besonders gut scharf zu stellen ist. Um bei allen drei Positionen auf die selbe Stelle innerhalb des Sichtfeldes fokussieren zu können, wird hier ein digitales Fadenkreuz gesetzt. Um Positionsfehler gering zu halten, werden die drei Punkte möglichst weit voneinander entfernt gewählt. In unserem Fall betrug der Abstand jeweils etwa $\Delta r \approx 3 \text{ mm}$. Das Abspeichern der drei Koordinaten des Hexapods und der z-Position des Piezofokus erfolgt über das hierfür in LabVIEW entwickelte Programm (siehe Abb. 3.3). Sind die Fokuspositionen von drei geeigneten Stellen auf dem Glasrand bestimmt, werden aus den Koordinaten die Drehwinkel berechnet und an den Treiber des Hexapod geschickt.

3. Ausrichtung der Probe für reproduzierbare, chronische in-vivo Aufnahmen

Die Berechnung der Drehwinkel erfolgte gemäß der Skizze in Abb. 3.4. Zunächst werden aus den drei Punkten die beiden Vektoren $\overrightarrow{P_1P_2}$ und $\overrightarrow{P_1P_3}$ gebildet. Deren Kreuzprodukt liefert den auf die Glasoberfläche senkrechten Normalenvektor \vec{n} . Die Winkeldifferenzen um die x- und y-Achse des Normalenvektors zum Einheitsvektor in z-Richtung \vec{e}_z werden trigonometrisch berechnet. Anhand der Markierung auf dem Rand des Glasfensters kann nach der Rotation überprüft werden, ob es tatsächlich exakt horizontal ausgerichtet ist. Dies ist nur dann der Fall, wenn die Markierung an jedem Punkt mit derselben Höhe von Hexapod und Piezofokus scharf ist (siehe hierzu die Weitfeldaufnahmen in Anh. B).

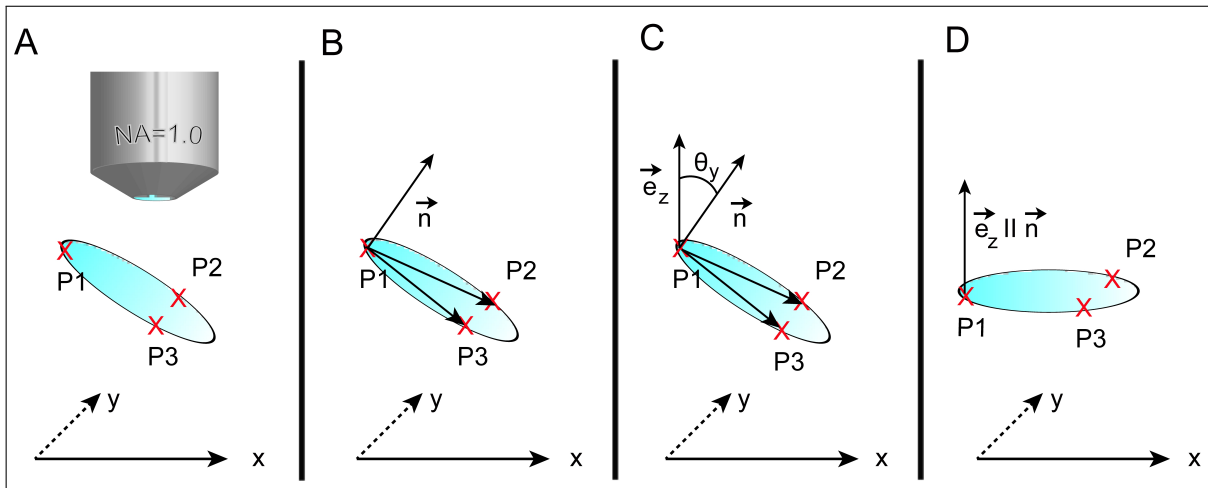


Abb. 3.4.: Ausrichtung der Oberfläche des kranialen Fensters (aus [Sch11]). Nach der Erfassung der x, y und z Koordinaten der drei Punkte P1, P2 und P3 auf der Glasoberfläche (A) generiert die Software die Vektornormale \vec{n} auf die Ebene, die deren Verbindungsvektoren aufspannen (B). Der Vektor \vec{n} ist das Kreuzprodukt der beiden Vektoren, die P1 mit P2 bzw. mit P3 verbinden. Der Winkel θ_y zwischen der Normalen \vec{n} und dem Einheitsvektor in z-Richtung \vec{e}_z wird trigonometrisch berechnet (C). Die Bestimmung des Winkels θ_x erfolgt analog. Die berechneten Winkel werden an den LabVIEW Treiber des Hexapods geschickt. Durch eine entsprechende Bewegung des Hexapods werden die Winkel daraufhin korrigiert (D).

3.3. Ergebnisse

Vor Ausrichtung der Maus auf dem Hexapod betrugen die Winkel bis zu $\theta_{x,y} = 8^\circ$. Mit der vorgestellten Methode konnten Winkel von unter $0,05^\circ$ erreicht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Höhendifferenzen von unter $10\ \mu\text{m}$ zwischen zwei gegenüberliegenden Sei-

ten des Glasfensters als horizontal betrachtet. Mit einem Durchmesser des Fensters von etwa 4 mm entspricht dies einem Winkel von $\theta = 0,14^\circ$. Typische Höhenunterschiede lagen jedoch bei weniger als 6 μm nach der Ausrichtung.

Abb. 3.5 zeigt die Auswirkung einer falschen dreidimensionalen Ausrichtung in der chronischen Mikroskopie. Sowohl im ausgerichteten als auch im nicht ausgerichteten Fall sind die Somata von drei Neuronen zu erkennen. Sie befinden sich im Gehirn in einer Tiefe von circa 200 μm . Vor der Drehung des kranialen Fensters in die Horizontale scheint es, als lägen alle drei in der gleichen Ebene. Nach der Ausrichtung gemäß der oben beschriebenen Vorgehensweise stellt sich jedoch heraus, dass ein Neuron etwa 10 μm tiefer liegt als die beiden anderen.

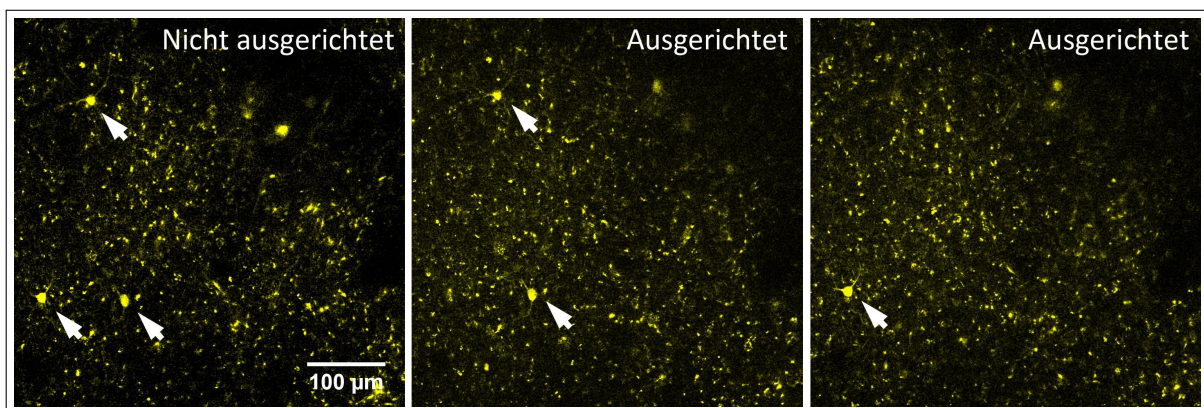


Abb. 3.5.: Verlorenes Neuron (aus [Sch11]). Die Neuronen befinden sich in einer Tiefe von etwa 200 μm im Gehirn. Während sie im nicht ausgerichteten Zustand alle in einer Ebene zu liegen scheinen, stellt sich im ausgerichteten Zustand heraus, dass eines 10 μm tiefer liegt als die anderen beiden. Die Bilder zeigen je ein 500 μm * 500 μm großes Areal.

Auch in Abb. 3.6 wird der anfängliche Winkel des Glasfensters deutlich. Bei schrägem Fenster erscheint die Probe zunächst nur einseitig und wandert mit zunehmender Tiefe mehr und mehr ins Bild. Erst nach weiteren 28 μm erscheint ein vollständiges Bild. Im Gegensatz dazu verschwindet bei ausgerichtetem Fenster die oben liegende Kollagenschicht gleichmäßig und in einer Tiefe von 16 μm kommen die darunter liegenden Neurone zum Vorschein.

In Abb. 3.7 sind die dazugehörigen Bildstapel in Seitenansicht zu sehen. Bei schrägem Fenster ist das keilförmige Volumen in der rechten oberen Ecke signalfrei. Erst in etwa 50 μm

3. Ausrichtung der Probe für reproduzierbare, chronische in-vivo Aufnahmen

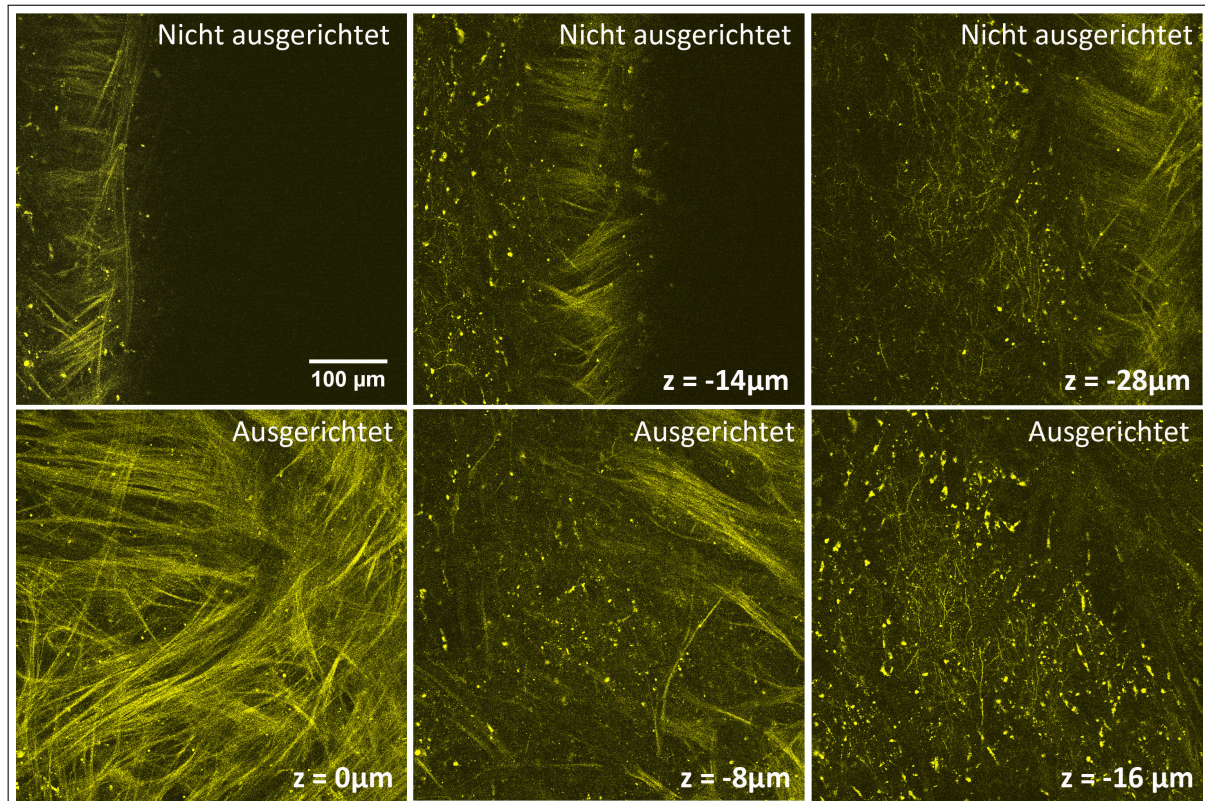


Abb. 3.6.: Effekt der dreidimensionalen Ausrichtung: Schräge Bilder (aus [Sch11]). Die beiden Bildsequenzen von YFP-markierten Neuronen zeigen den Effekt der dreidimensionalen Ausrichtung. Die Bilder wurden vor der Ausrichtung unter einem Winkel aufgenommen. Nachdem die Maus um $\Theta_x = -0.1^\circ$ und $\Theta_y = -6^\circ$ gedreht wurde, erfolgte die Bildaufnahme exakt horizontal und damit parallel zur Glasoberfläche. Im nicht ausgerichteten Fall beträgt der Abstand zwischen den Ebenen 14 μm , im ausgerichteten Fall 8 μm . Die Bilder zeigen je ein 500 μm * 500 μm großes Areal.

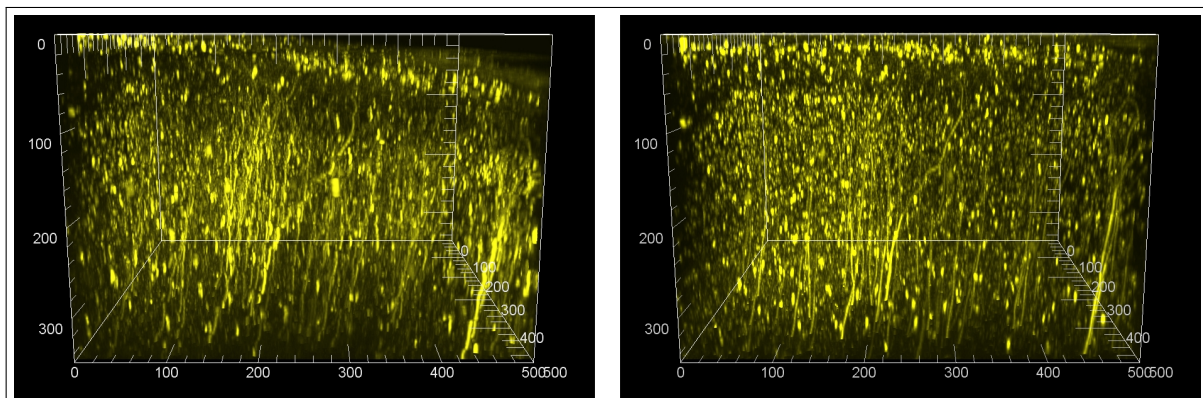


Abb. 3.7.: Effekt der dreidimensionalen Ausrichtung: Bildstapel seitlich betrachtet (aus [Sch11]). Die Volumina (500 μm * 500 μm * 350 μm) der beiden Bildstapel aus Abb. 3.6 werden seitlich betrachtet. Dies zeigt den Winkel im nicht ausgerichteten Fall (links) und das Volumen, das folglich bei der Bildaufnahme verloren geht im Vergleich zum ausgerichteten Fall (rechts).

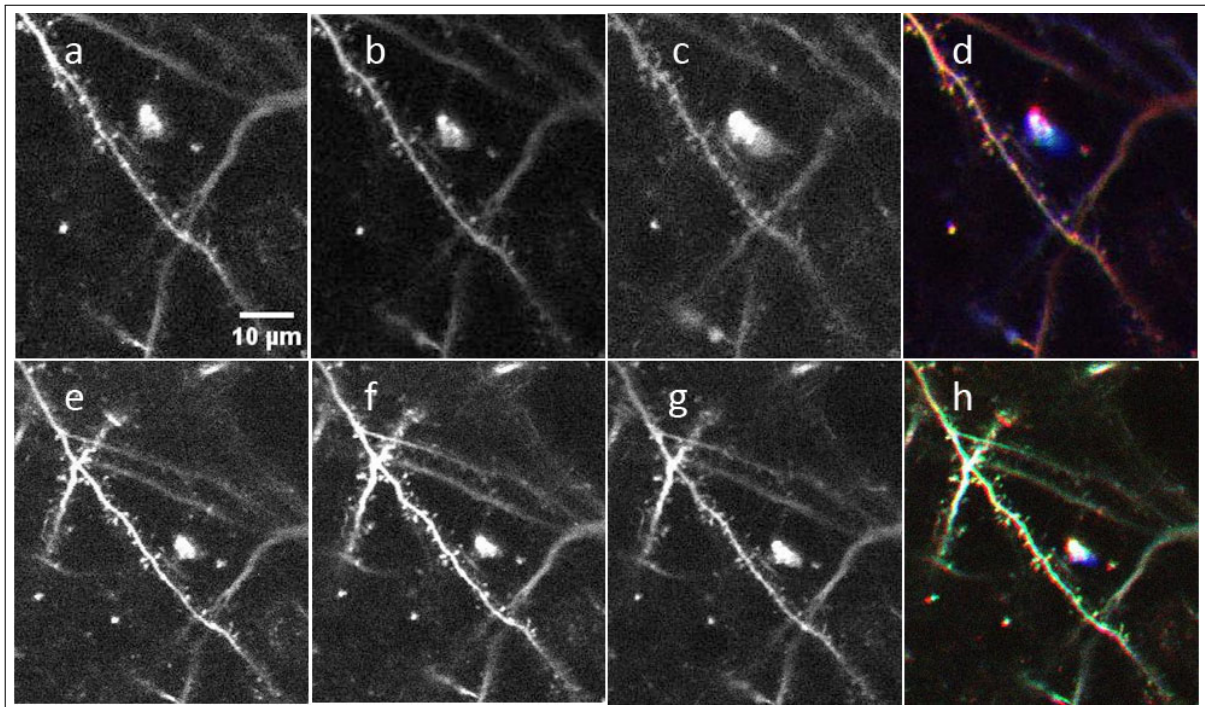


Abb. 3.8.: Überlagerung von Bildern einer Struktur mit und ohne Ausrichtung. Bilder a, b und c zeigen einen Dendriten zu verschiedenen Zeitpunkten, ohne dass das Fenster der Maus vorher horizontal ausgerichtet wurde. Eine Überlagerung dieser drei Bilder ergibt Bild d, wobei jedem der Einzelbilder je ein Farbkanal (rot, grün, blau) zugeordnet wurde. Nur bei einer vorhergehenden Ausrichtung (Bilder e, f, g) ergibt sich jedoch eine annähernd weiße Farbe im Gesamtbild h, die auf die Übereinstimmung aller drei Teilbilder zurückzuführen ist.

Tiefe wird im gesamten Bild Fluoreszenz detektiert (bei einer Kantenlänge von 500 µm entspricht dies einem Winkel von $\theta_y = -6^\circ$). Dies ist im rechten Bildstapel bei korrigiertem Winkel erwartungsgemäß ausgeglichen. Dies hat zur Folge, dass auch die Wegstrecken, die die Photonen innerhalb der Probe zurücklegen müssen, im gesamten Bild gleich lang sind. Im Gegensatz hierzu kommt es bei schrägem Glasfenster zu unterschiedlich starker Streuung zu beiden Seiten des Bildes und damit womöglich zu inhomogener Intensität des Fluoreszenzsignals. Die horizontale Ausrichtung des kranialen Fensters bietet damit folglich beste Konditionen für die chronische in-vivo Mikroskopie.

Abb. 3.8 zeigt sechs verschiedene Aufnahmen des selben Dendriten, die die Reproduzierbarkeit des Ergebnisses bei einer dreidimensionalen Ausrichtung verdeutlichen. Sowohl bei schrägem Schädelfenster als auch nach dessen horizontaler Ausrichtung wurden je drei Auf-

3. Ausrichtung der Probe für reproduzierbare, chronische in-vivo Aufnahmen

nahmen gemacht, denen je ein Farbkanal (rot, grün, blau) zugeordnet wurde. Deren Überlagerung ergibt folglich im besten Fall wieder ein Bild, in dem der Dendrit weiß erscheint. Während die Überlagerung der Einzelbilder a, b und c kaum in Übereinstimmung (d) zu bringen ist, ergeben die Einzelbilder im ausgerichteten Fall (e, f, g) ein deutlich besseres Ergebnis. Es sei darauf hingewiesen, dass diese Bilder in nur einer Sitzung entstanden sind. Es handelt sich daher nicht um zufällig aufgetretene Veränderungen, sondern um beabsichtigte Drehungen des Tiers um je $\Theta_x = 1^\circ$ zwischen den Einzelbildern zu Demonstrationszwecken. Das Tier wurde jedoch nach jeder Drehung neu ausgerichtet, um die Reproduzierbarkeit des Ergebnisses der entwickelten Methode zu zeigen.

Die entwickelte Methode zur dreidimensionalen Ausrichtung von Versuchstieren für chronische in-vivo Mikroskopie und die vorgestellten Ergebnisse wurden im Jahr 2011 publiziert [[Sch11](#)].

4. Trajektorienscan

Verglichen mit der Weitfeld-Mikroskopie, bei der oft schnelle CCD- oder sCMOS-Kameras eingesetzt werden, ist die Zweiphotonenmikroskopie eine sehr langsame Technik, bei der der Laserstrahl das Präparat in zwei Dimensionen Pixel für Pixel abrastert. Für schnelle Vorgänge, wie zum Beispiel Kalzium-Reaktionen, ist die zeitliche Auflösung daher nicht hoch genug. Oft wird das Problem durch Linienscans gelöst [[Gol03a](#), [Sto03](#)], was allerdings der zu untersuchenden Struktur nicht gerecht wird, die gewöhnlich dreidimensional ist. Es wurde daher bereits vereinzelt mit Trajektorienscans experimentiert [[Gö7](#), [Kat11](#)]. In diesem Fall rastert der fokussierte Laserstrahl das Präparat nicht konventionell in einer Rechteck- oder Linienform ab, um ein ein- oder zweidimensionales Bild zu liefern, sondern fährt auf vom Benutzer vorgegebenen, dreidimensionalen Trajektorien durch die Probe. Es kann so einer bestimmten Struktur, wie zum Beispiel einem Dendriten, durch den Raum gefolgt werden, um sie für die Zeitspanne der Reaktion wiederholt abzuscannen. Hierbei werden hohe Scanfrequenzen erreicht, so dass eine Kalziumreaktion detektiert und ihr zeitlicher Verlauf beobachtet werden kann.

Bisher gibt es nur wenig veröffentlichtes Material zu vergleichbaren Methoden. Es sind beispielsweise Trajektorienscans bekannt, die eine vom Benutzer vorgegebene Bahn in der Probe abscannen, jedoch nur in zwei Dimensionen [[Lil08](#)]. Es wurde außerdem mit 3D Scanmustern experimentiert, die ein bestimmtes Volumen bestmöglich abdecken sollen, jedoch nicht an vorhandene Strukturen im einzelnen Präparat angepasst sind [[Gö7](#)]. Schließlich gibt es 3D Scans, die mit benutzerbestimmten Trajektorien Dendriten abscannen, jedoch eine andere Technik nutzen, als die hier präsentierte [[Kat11](#)]. Im Gegensatz zur hier verwendeten magnetischen Schwingspule, im Folgenden Voice Coil genannt, wurde in den bisher bekannten

Techniken mit Piezoaktuatoren gearbeitet, um das Objektiv in axialer Richtung zu bewegen. In Kap. 4.2.1 wird die Leistung der Voice Coil charakterisiert und ihre Eignung für Trajektorienscans in Abhängigkeit von Amplitude und Frequenz getestet. In Kap. 4.3.2 wird ihr Einsatz bei Trajektorienscans in Dendriten demonstriert.

Zusätzlich soll hier gezeigt werden, dass auch an andere Präparate und deren mikroskopische Strukturen angepasste Scanmodi möglich sind (siehe Kap. 4.2.3). Insbesondere wird demonstriert, wie konventionelle zweidimensionale Scans effektiv mit Trajektorienscans kombiniert werden können. Statt durch den Benutzer vorgegebene Punkte zu einem Trajektorienscan zu verknüpfen, werden nacheinander kleine zweidimensionale Bilder in der Größenordnung von mehreren Mikrometern an gewünschten Orten im dreidimensionalen Präparat gemacht. Damit können beispielsweise Somata in der Probe verteilter Zellen mit hoher Zeitauflösung und - aufgrund der im Gegensatz zum Linien-scan großen Fläche, die in der Zelle abgescannt wird - bei Kalziumreaktionen mit einem hohen Signal-Rausch-Verhältnis beobachtet werden. Dies wird am Beispiel einer Reaktion benachbarter Nervenzellen auf die Zerstörung eines Neurons und der dadurch erhöhten Adenosintriphosphat-Konzentration in ihrer Umgebung gezeigt (siehe Kap. 4.3.2).

4.1. Motivation: Anwendungen in biologischem Gewebe

4.1.1. Dendriten in der medialen oberen Olive im Hörsystem der Wüstenrennmaus

Reaktionen in Neuronen des auditorischen Systems zählen zu den schnellsten, die im Gehirn von Säugetieren vorkommen. Im Rahmen dieser Arbeit werden zur Demonstration des entwickelten Trajektorienscans Neurone der medialen oberen Olive (medial superior olive, MSO) in Hirnschnitten Mongolischer Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*) betrachtet. Diese bipolaren Nervenzellen verarbeiten interaurale Zeitdifferenzen akustischer Signale (interaural

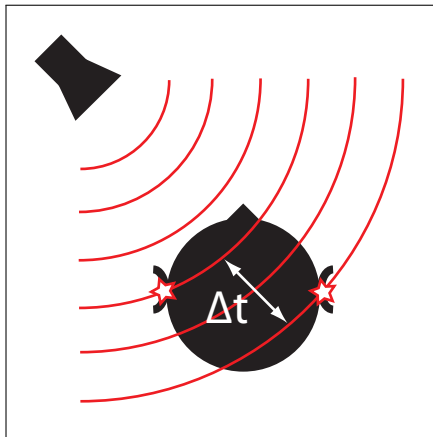


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der interauralen Zeitdifferenz (ITD) akustischer Signale. Durch Koinzidenzdetektionsmechanismen in der medialen oberen Olive im Hörsystem des Gehirns werden Stereo-Hören und Geräuschlokalisation ermöglicht.

time differences, ITDs, siehe Abb. 4.1), um eine Geräuschquelle in der horizontalen Ebene zu lokalisieren [Gro10]. Genau wie Menschen [Klu56, Mil58] nutzen Mongolische Wüstenrennmäuse niederfrequente Schallsignale und haben eine hochentwickelte MSO [Rya76]. Die MSO prozessiert diese extrem kurzen ITDs durch präzise Koinzidenzdetektionsmechanismen [Gol69, Yin90, Bra02]. Es handelt sich hier um zeitliche Signale im Mikrosekundenbereich, deren Dauer damit um nahezu zwei Größenordnungen kleiner ist als die der Aktionspotentiale, die die zugehörige Information tragen. Damit ist dies der schnellste bekannte Koinzidenzdetektionsnukleus in Säugetieren [Cou10]. Dies macht die wissenschaftliche Erforschung dieses Areals sowohl besonders interessant als auch anspruchsvoll.

Die zu untersuchenden bipolaren Neurone der MSO besitzen typischerweise zwei (manchmal drei) Dornfortsatz-freie Dendriten, die sich von zwei Enden des Somas in entgegengesetzter Richtung erstrecken [RyC95, Rau09], siehe Abb. 4.2. Die Dendriten haben einen Durchmesser von ca. 2-6 μm , der mit wachsendem Abstand vom Soma leicht abnimmt [Rau09].

Durch benutzerbestimmte, dreidimensionale Trajektorien-Scans konnten in solchen Dendriten in Hirnschnitten von Mongolischen Wüstenrennmäusen unter Verwendung von Kalziumionen-sensitiven Fluorophoren spontane und stimulierte Erhöhungen der Kalziumionenkonzentration detektiert werden (siehe Kap. 4.3.2). Die vorgestellte Methode, schematisch dargestellt in Abb. 4.3, eignet sich daher zur Beantwortung komplexer Fragestellungen, die mit bisherigen Techniken aufgrund von mangelnder Zeit- oder Ortsauflösung, bzw. Eindringtiefe, nicht geklärt werden konnten.

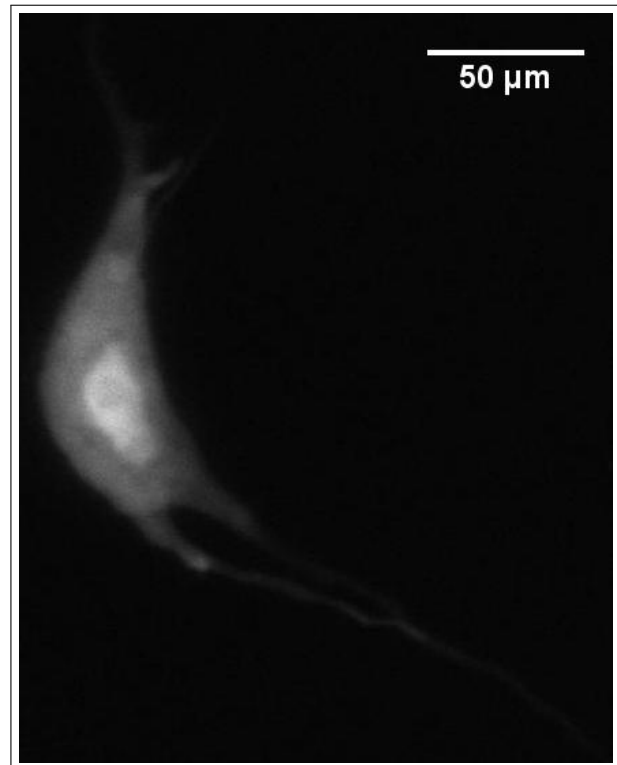


Abb. 4.2: Zweiphotonenaufnahme eines bipolaren MSO-Neurons. Es ist der längliche Zellkörper zu sehen, sowie die beiden Dendriten, die an den beiden entgegengesetzten Enden vom Soma abgehen. Die Aufnahme ist eine z-Projektion aus insgesamt 35 Bildern im Abstand von 1 µm.

4.1.2. Neurone in Spinalganglien von Hühnerembryos

Spinalganglien sind Teil des somatosensorischen Nervensystems. Sie befinden sich beidseitig entlang der Wirbelsäule und bündeln die Zellkörper sensorischer Axone, die Haut, Muskeln und Gelenke innervieren. Diese treten von dort durch die Hinterwurzeln ins Rückenmark ein [Bea07] und leiten so Informationen aus der Peripherie des Körpers ins zentrale Nervensystem.

Mit der Frage, wie eine solch große Anzahl von Neuronen im zentralen Nervensystem sich durch eine schier unendlich scheinende Menge von Synapsen zu einem funktionierenden Ganzen zusammenschließen kann, beschäftigt sich die Wissenschaft seit Jahrzehnten [Goo96, Gol03b]. Wie und durch welche physikalischen oder chemischen Signale findet ein wachsendes Neuron sein Ziel? Für die wissenschaftliche Erforschung von neuronalen Wachstumsregeln werden heute häufig Spinalganglien aus Embryonen des Haushuhns (*Gallus gallus*) verwendet. In *in-vitro* Versuchen wurde beispielsweise das Wachstum ihrer Neuriten unter Einfluss von Konzentrationsgradienten richtungsweisender Moleküle untersucht [Mue99,

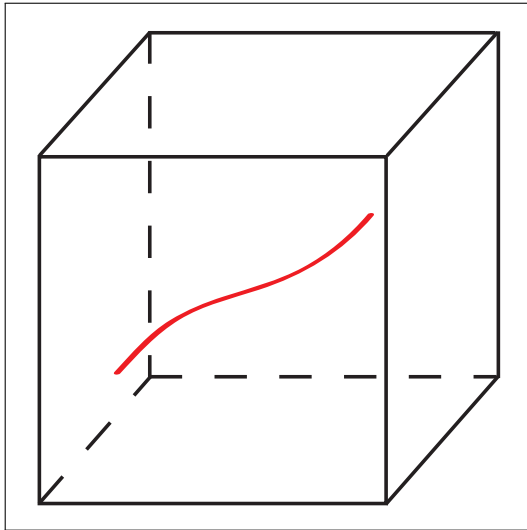


Abb. 4.3.: Schematische Darstellung eines Trajektorienscans, der einem Dendriten angepasst ist

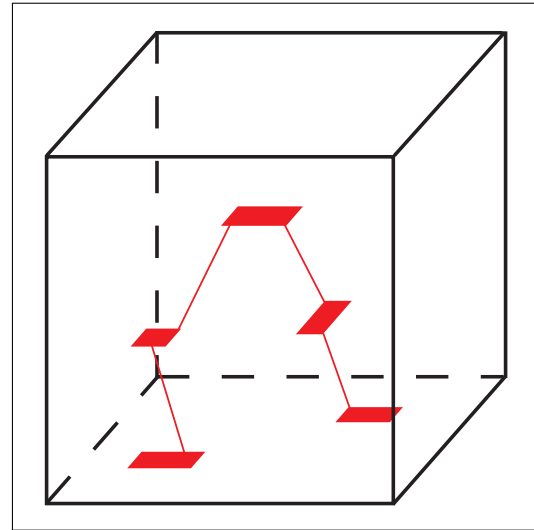


Abb. 4.4.: Schematische Darstellung eines Trajektorienscans, der der Lage verschiedener Neurone innerhalb eines Ganglions angepasst ist

[Mun04](#), [Gra08](#)].

Die Frage, wie Neurone innerhalb eines Ganglions miteinander verknüpft sein könnten, war Motivation zur Entwicklung eines Trajektorienscans, der benutzerbestimmte Punkte nicht einfach zu einer Linie verknüpft, sondern jeweils einen kleinen zweidimensionalen Bildscan ausführt (Abb. 4.4). Diese Art von Scanmodus könnte die Beobachtung der Reaktion miteinander verknüpfter Neurone auf die Stimulation einer dieser Zellen, bzw. ihres Neuriten, ermöglichen.

Zum Test auf Funktionsfähigkeit wurde innerhalb des Ganglions ein Kalziumioneneinstrom forciert und die Reaktion der umliegenden Neurone unter Verwendung des Trajektorienscans beobachtet. Hierzu wurde eines der Neurone mit hoher Laserleistung zerstört, um Adenosintriphosphat (ATP) aus dessen Zellinneren freizusetzen. Hierdurch werden die Ca^{2+} -Kanäle der benachbarten Zellen aktiviert, und die Ca^{2+} -Konzentration erhöht sich in deren Zellinneren (Kap. 4.3.2). Dieser Versuch wurde aus technischen Gründen durchgeführt und hat per se keinerlei biologische Relevanz. Er diente jedoch zur Entwicklung der Methode und zur Charakterisierung des Systems.

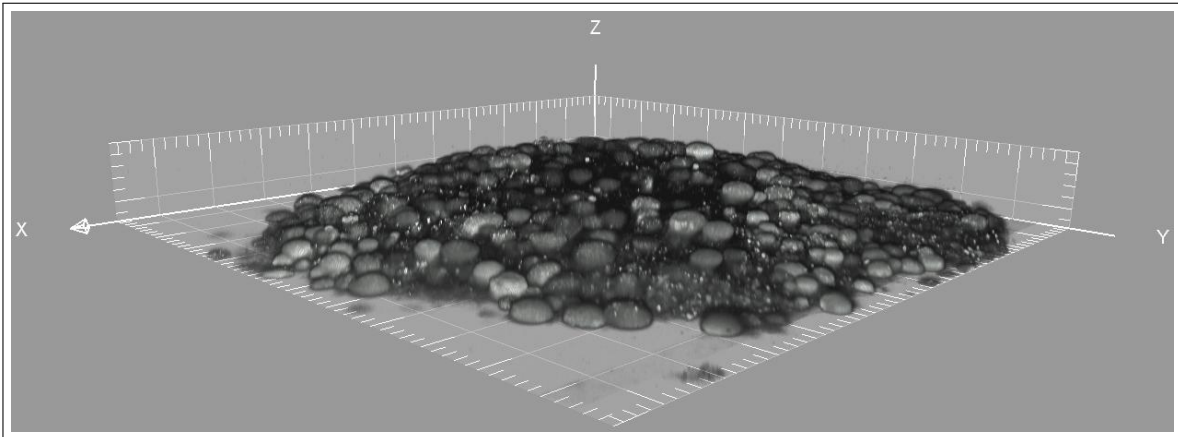


Abb. 4.5.: Rekonstruktion eines Ganglions aus einem Bilderstapel, aufgenommen mit dem in Kap. 2.1 beschriebenen Zweiphotonenmikroskop. Der Durchmesser des Ganglions beträgt etwa 600 μm .

4.2. Materialien und Methoden

4.2.1. Hardware

Spezifikationen der Galvoscanner

Für die Bewegung des Laserfokus in lateraler Richtung wurden zwei Galvanometer-Scanner mit aufgeklebtem Spiegel eingesetzt (Model 6210H, Cambridge Technology, Inc, Cambridge, Massachusetts, USA), die durch passende Elektronik (DC900, Smart Move GmbH, Martinsried, Deutschland) gesteuert werden. Diese bieten einen mechanischen Drehwinkel von $\pm 15^\circ$ was optisch $\pm 30^\circ$ entsprechen, da sich Einfalls- und Ausfallswinkel addieren. Die Winkelposition lässt sich digital mit einer Auflösung von 16 Bit ansteuern.

Für die Trajektorienscans ist letztlich die maximal erreichbare Beschleunigung ausschlaggebend, bzw. ob die gewünschte Beschleunigung für eine bestimmte Trajektorie ohne Überhitzung möglich ist. Das Drehmoment beträgt laut Hersteller $2,79 \times 10^4 \text{ dyn cm/A}$, umgerechnet $2,79 \times 10^{-3} \text{ N m/A}$. Die Trägheit wird auf $0,018 \text{ g cm}^2 = 1,8 \times 10^{-9} \text{ kg m}^2$ spezifiziert. Mit einer maximalen Spannung von 23 V und einem Spulenwiderstand von $3,72 \Omega$ lässt sich die Beschleunigung wie folgt berechnen:

$$\text{Beschleunigung}[\text{°}/\text{s}^2] = \left(\frac{\text{Drehmoment}[\frac{\text{dyn} \cdot \text{cm}}{\text{A}}]}{\text{Trägheit}[\text{g} \cdot \text{cm}^2]} \right) \times \text{Strom}[\text{A}] \quad (4.1)$$

Der Strom setzt sich dabei aus der Spannung und dem Spulenwiderstand zusammen:

$$\text{Strom}[\text{A}] = \left(\frac{\text{Spannung}[\text{V}]}{\text{Widerstand}[\Omega]} \right) \quad (4.2)$$

Dies ergibt einen Strom von 6,2 A. Er wird jedoch zusätzlich softwareseitig auf den vom Hersteller des Scankopfs spezifizierten Grenzwert von 8 A beschränkt. Es ergibt sich eine Maximalbeschleunigung von $9,61 \times 10^6 \text{ °}/\text{s}^2$.

Aufgrund der kleinen Spiegel und der geringen Masse der Galvanometer-Scanner ist ihre Leistung daher auch für sehr schnelle Trajektorienscans nicht limitierend. Ein solcher ist in Abb. 4.6 dargestellt, jedoch für Demonstrationszwecke nur in zwei Dimensionen. Hierzu wurde mit dem Zweiphotonenmikroskop ein Bild einer Papierprobe aufgenommen, in das zuvor eine Trajektorie mit hoher Laserleistung hineingebleicht wurde. Diese wurde mit einer Frequenz von knapp 250 Hz ca. 1000 mal abgefahren, damit die Bleichung deutlich sichtbar ist. Die Bleichkurve in Abb. 4.6 ist erwartungsgemäß stabil und die Wendepunkte nicht abgerundet.

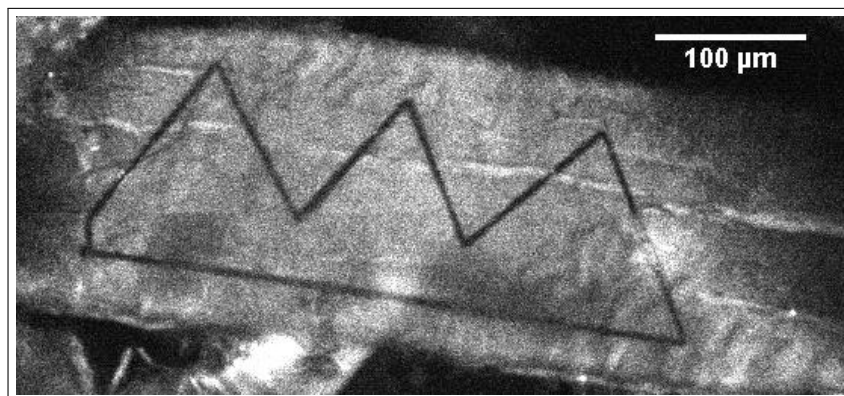


Abb. 4.6.: Trajektorienscan in der xy-Ebene

Spezifikationen der Voice Coil

Die verwendete Schwingspule (Voice Coil) Modell VLR0033-0099-00A (Willburger System GmbH, Seehausen, Deutschland) bietet einen Hub von 9,9 mm und dabei eine Positioniergenauigkeit von 10 nm (siehe Abb. 4.7). Bei einer optischen axialen Auflösung von etwa einem Mikrometer (siehe Kap. 2.2) ist dies absolut ausreichend. Zusätzlich kann durch den großen Hub bei manchen Anwendungen sogar auf einen in axialer Richtung beweglichen Mikroskopisch verzichtet werden.

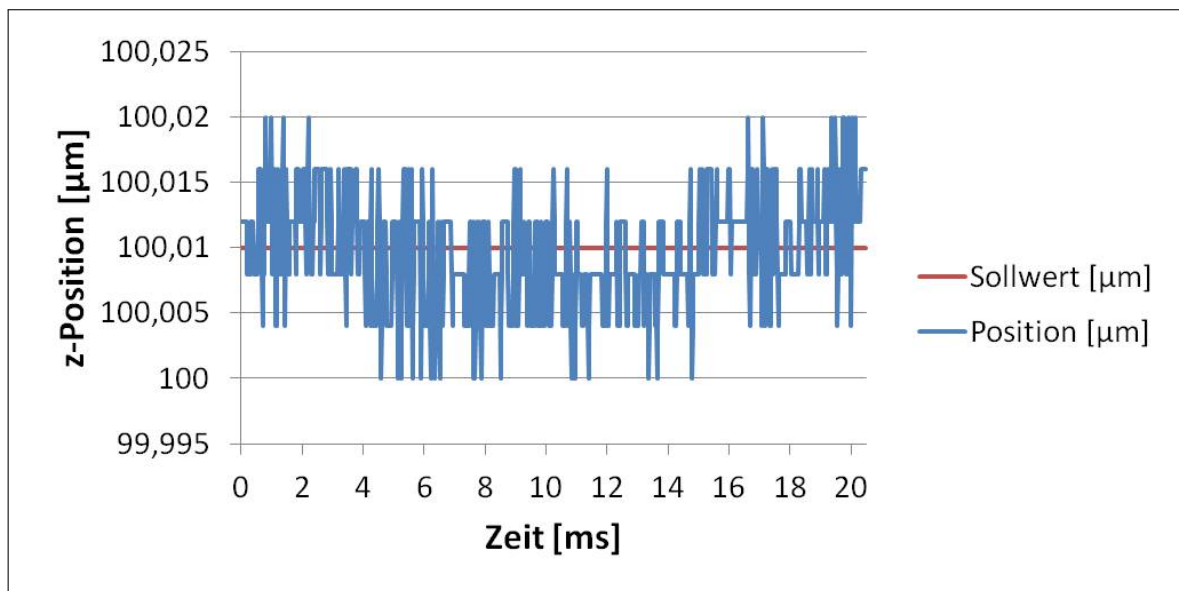


Abb. 4.7.: Messwerte zur Positionsgenauigkeit der Voice Coil. Sollwert (100,01 μm) und die tatsächliche Position wurden über die Zeit aufgezeichnet. Die Position weicht dabei höchstens um ± 10 nm vom gewünschten Wert ab.

Die Kraftkonstante der Voice Coil beträgt 5,87 N/A. Bei einem experimentell ermittelten, maximalen Strom von 0,23 A ergibt dies für unser Objektiv mit einer Masse von 654 g eine maximale Beschleunigung von 2,06 m/s^2 :

$$\text{Beschleunigung}\left[\frac{\text{m}}{\text{s}^2}\right] = \left(\frac{\text{Kraftkonstante}\left[\frac{\text{N}}{\text{A}}\right] * \text{Strom}[\text{A}]}{\text{Masse}[\text{kg}]}\right) \quad (4.3)$$

Sinus- und Dreiecksmessungen

Um die Leistungsfähigkeit der Voice Coil und ihre Eignung für schnelle dreidimensionale Trajektorienscans zu analysieren, wurden verschiedene Bewegungsmuster in Abhängigkeit von Amplitude und Frequenz untersucht. Hierfür wurde die Software *Smart Connect* des Herstellers Smart Move GmbH (Martinsried, Deutschland) genutzt. Diese stellt einen über eine serielle Schnittstelle angesteuerten Wellengenerator zur Verfügung und liest die tatsächlich gefahrenen Kurven zurück. Es wurden sowohl Dreieck- als auch Sinuskurven mit Frequenzen von 50 Hz bis 200 Hz und mit Amplituden von 1 μm bis 20 μm gefahren. Hierbei fällt auf, dass es zwischen dem Befehl und der tatsächlichen Ausführung der Bewegung eine zeitliche Differenz gibt, die im Wesentlichen von der Frequenz der auszuführenden Kurve abhängt. Zusätzlich muss auch die Amplitude frequenzabhängig korrigiert werden, da diese in den meisten Fällen zu gering ausfällt. In Abb. 4.8 ist sowohl die zeitliche als auch die räumliche Abweichung der Position vom Sollwert am Beispiel einer Sinuskurve mit einer Amplitude von 1 μm bei einer Frequenz von 50 Hz zu sehen. Die zeitliche Differenz beträgt in diesem Fall $\Delta t = 1,76$ ms. Der Befehl müsste in einem Messprotokoll in diesem Fall folglich immer 1,76 ms vor dem gewollten Zeitpunkt der Ausführung kommen, damit die z-Position zu jeder Zeit korrekt ist. Dies ist insbesondere wichtig, um die Bewegung des z-Triebs mit der der xy-Scanner zu korrelieren.

Die Amplitude beträgt lediglich 80 % des gewünschten Werts. Auch dies muss in einem Trajektorienscan durch entsprechend höhere Sollwerte korrigiert werden.

Eine Dreieckskurve mit den gleichen Parametern ist in Abb. 4.9 dargestellt. Hier beträgt die zeitliche Differenz $\Delta t = 1,86$ ms, die Amplitude liegt bei 70 % des Sollwerts. Sämtliche Diagramme zu den Sinuskurven mit höherer Frequenz und Amplitude sind in Anhang C.1 zu sehen, die für die Dreieckskurven befinden sich in Anhang C.2. Die ausgewerteten zeitlichen und räumlichen Abweichungen vom Sollwert sind in den folgenden Tabellen 4.1 bis 4.4 aufgelistet. Hierbei ist zu beachten, dass auch die vom Wellengenerator der Software *Smart-Connect* generierten Befehle nicht immer dem tatsächlich gewünschten Sollwert entsprechen, da diese intern nochmals verarbeitet werden. Dies ist ansatzweise in Abb. 4.9 zu sehen, wo

4. Trajektorienscan

der Maximalwert von 1001 μm auch bei der Kurve des Sollwerts nicht erreicht wird. Dieser Mangel kann jedoch durch einen entsprechend erhöhten Sollwert ausgeglichen werden. Die Werte zur Amplitudenkorrektur in Tab. 4.1 und 4.2 beziehen sich daher auf die Abweichung zum tatsächlichen Wunschwert, und nicht zum dargestellten Sollwert.

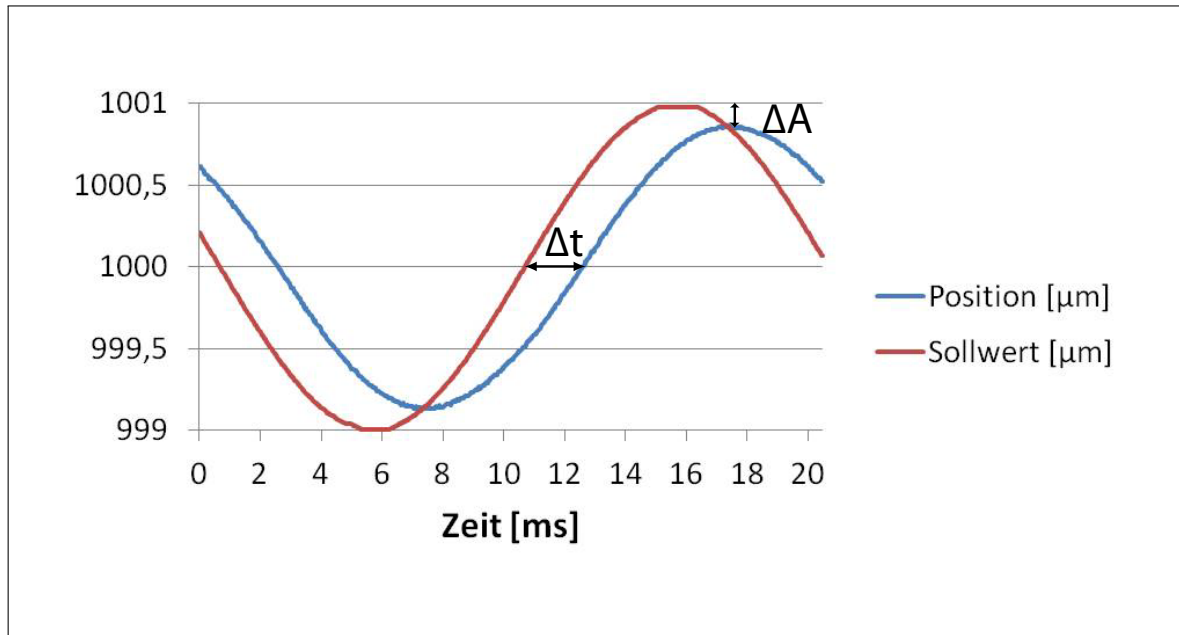


Abb. 4.8.: Sinuskurve mit 1 μm Amplitude bei 50 Hz

Amplitude	50 Hz	100 Hz	150 Hz	200 Hz
1 μm	0,8	0,8	0,85	0,35
2,5 μm	0,9	1,0	0,9	0,3
5 μm	1,0	1,1	0,8	0,2
10 μm	1,0	1,1	0,6	0,2
15 μm	1,05	1,15	0,5	0,15
20 μm	1,05	1,2	0,25	0,2

Tabelle 4.1.: Abweichung der Amplitude vom Sollwert bei Sinusbewegungen der Voice Coil. Die Tabelle fasst die Verhältnisse von tatsächlicher Position zum Sollwert der Amplitude für Sinusbewegungen der Voice Coil mit Frequenzen von 50 Hz bis 200 Hz und Amplituden von 1 μm bis 20 μm zusammen. In den meisten Fällen fällt die Amplitude zu gering aus. Es ist zu beachten, dass auch die vom Wellengenerator der Software *SmartConnect* generierten Befehle nicht immer dem tatsächlich gewünschten Sollwert entsprechen. Die Werte in der Tabelle beziehen sich daher auf die Abweichung zum tatsächlichen Wunschwert.

Diese Testmessungen belegen klar die Überlegenheit der Sinuskurve. Denn schon bei nied-

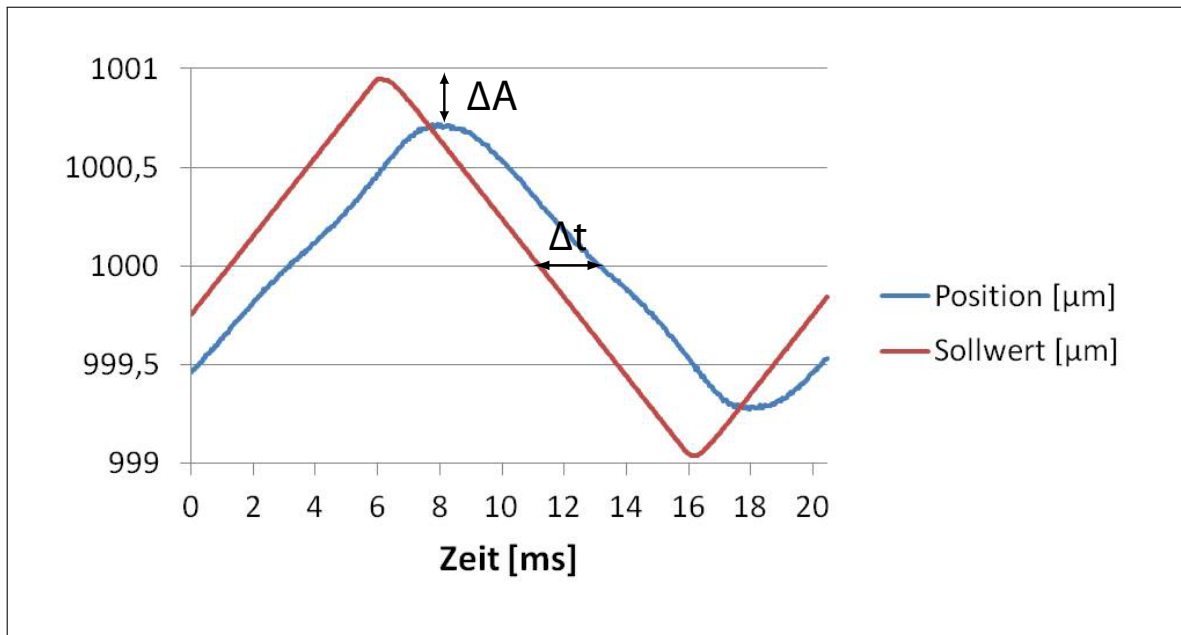


Abb. 4.9.: Dreieckskurve mit 1 μm Amplitude bei 50 Hz

Amplitude	50 Hz	100 Hz	150 Hz	200 Hz
1 μm	0,7	0,7	0,6	0,1
2,5 μm	0,8	0,8	0,6	0,1
5 μm	0,85	0,85	0,6	0,1
10 μm	0,8	0,85	0,55	0,1
15 μm	0,85	0,85	0,35	0,1
20 μm	0,85	0,85	0,35	0,1

Tabelle 4.2.: Abweichung der Amplitude vom Sollwert bei Dreiecksbewegungen der Voice Coil. Die Tabelle fasst analog zur vorhergehenden das Verhältnis von tatsächlicher Position zum Sollwert der Amplitude der Voice Coil für Dreieckskurven zusammen. Die Amplitude fällt hier für alle Messungen zu gering aus.

rigen Frequenzen und Amplituden verschleift sich die Dreieckskurve ohnehin derart, dass sie tatsächlich mehr einem Sinus ähnelt, als dem eigentlich gewollten Dreieck (Anhang C.2). Dies wird auch für andere, benutzerbestimmte Bewegungsmuster erwartet, die beispielsweise Koordinaten linear im Raum verbinden, da die Trägheit der Voice Coil keine zu starken Beschleunigungen erlaubt.

Für die Programmierung der Trajektorienscans wurde daher entschieden, diese in axialer Richtung auf Sinusbewegungen zu basieren. Hierzu werden die Geschwindigkeiten zwischen

4. Trajektorienscan

Amplitude	50 Hz	100 Hz	150 Hz	200 Hz
1 μm	1,76	1,76	1,96	2,16
2,5 μm	1,76	1,76	2,36	2,36
5 μm	1,7	1,76	2,52	2,36
10 μm	1,72	1,86	2,46	2,16
15 μm	1,7	1,9	2,26	1,56
20 μm	1,66	1,96	1,96	1,56

Tabelle 4.3.: Zeitverzögerung bei Sinusbewegungen der Voice Coil in Millisekunden. Die Werte der Zeitverzögerung zwischen Befehl und Ausführung der Kurve sind hier für alle gemessenen Frequenzen und Amplituden in Millisekunden aufgelistet.

Amplitude	50 Hz	100 Hz	150 Hz	200 Hz
1 μm	1,86	1,76	2,16	1,96
2,5 μm	1,86	1,86	2,56	1,76
5 μm	1,7	1,76	2,56	1,76
10 μm	1,72	1,86	2,56	1,76
15 μm	1,76	1,76	2,36	1,76
20 μm	1,66	1,86	2,46	1,56

Tabelle 4.4.: Zeitverzögerung bei Dreieckbewegungen der Voice Coil in Millisekunden. Die Werte der Zeitverzögerung zwischen Befehl und Ausführung der Kurve sind hier für alle gemessenen Frequenzen und Amplituden in Millisekunden aufgelistet.

den Punkten, durch die die Trajektorie verlaufen soll, so bestimmt, dass diese stets zu Zeitpunkten erreicht werden, die einer Sinuskurve durch ihre z-Koordinaten entsprechen. Messungen hierzu werden im Ergebnisteil (Kap. 4.3.1) präsentiert.

Sprungmessungen

Schließlich wurden neben Sinus- und Dreieckkurven auch Sprünge mit einem Hub von 2 μm bis 40 μm getestet. Dies dient der Untersuchung des Verhaltens der Voice Coil während Trajektorienscans in Ganglien, bei denen an verschiedenen Orten im Gewebe kleine zweidimensionale Bilder gemacht werden sollen, die durch Sprünge verbunden sind. Abb. 4.10 zeigt einen Sprung mit 5 μm Hub. Es ist zu sehen, dass man die Kurve der tatsächlich gemessenen Position um $\Delta t = 2,76$ ms verschieben muss, damit die obere Position zum gewünschten Zeitpunkt erreicht wird. Der Befehl müsste in einem Messprotokoll dementsprechend 2,76 ms früher kommen. Diese zeitliche Differenz ist bei allen gemessenen Sprüngen mit einem

Hub von 2 μm bis 40 μm gleich (siehe Diagramme in Anhang C.3). Durch die Trägheit der hohen Masse der Voice Coil zusammen mit dem Objektiv schwingt sie dann aber zunächst über und pendelt sich nach weiteren 3,4 ms schließlich auf den gewünschten Wert ein. Diese Überschwingzeit beträgt bei allen Sprüngen von 5 μm bis 40 μm 3,4 ms; nur bei 2 μm sind es lediglich 2,02 ms.

Bei einem Durchmesser der Neurone im Ganglion von ca. 15 μm befindet sich der Fokus des Objektivs jedoch trotz des Über- und Einschwingvorgangs stets innerhalb der gewünschten Zelle.

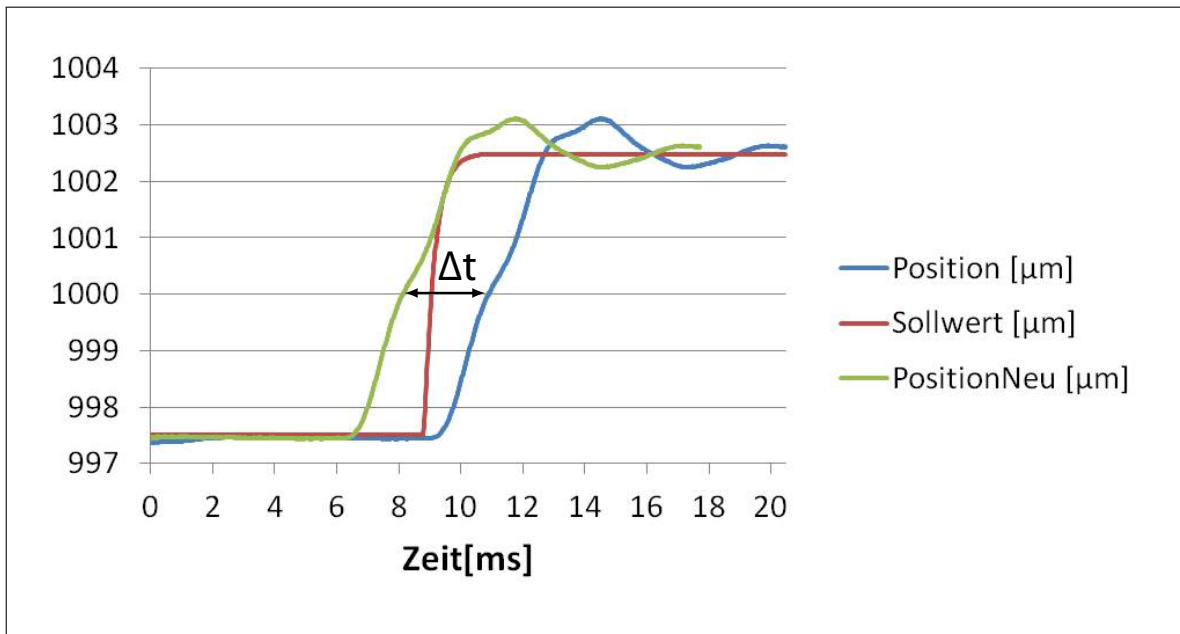
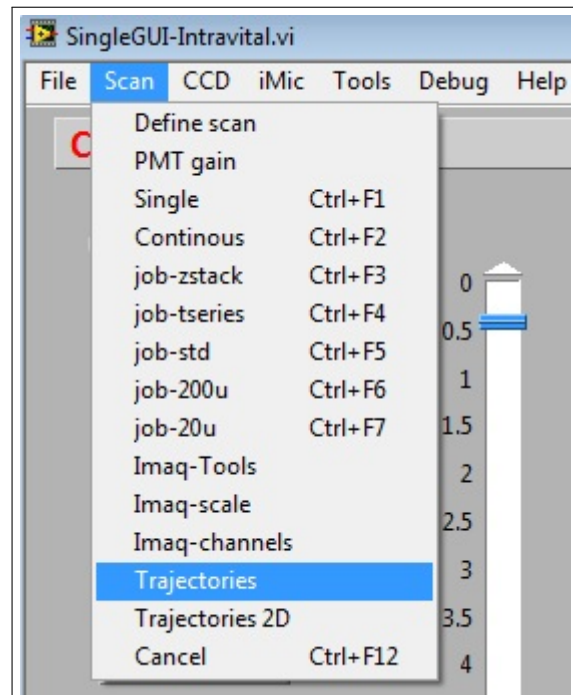


Abb. 4.10.: Sprung mit 5 μm Hub

4.2.2. Software

Die Benutzeroberfläche und die zugehörige Software unterscheiden sich leicht für die Linientrajektorie und die Trajektorie, die sich aus zweidimensionalen Bildern zusammensetzt. Es wird zunächst die Software für die Linientrajektorie beschrieben, die für die Scans in Dendriten in Neuronen des akustischen Systems der Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*) eingesetzt wurde (siehe hierzu die Motivation in Kap. 4.1.1 und die Ergebnisse in 4.3.2).

Abb. 4.11: Menü der Software Colibri, in dem man den Trajektorienscan starten kann. Unter dem Menüpunkt *Scan* kann die Benutzeroberfläche des Linientrajektoriscans („Trajectories“) und die für die Trajektorie, die aus zweidimensionalen Bildern zusammengesetzt ist („Trajectories 2D“), ausgewählt werden.



Anschließend wird das Vorgehen beim Scan im Spinalganglion in Embryonen des Haushuhns (*Gallus gallus*) dargestellt, bei dem kleine zweidimensionale Scans zusammengesetzt werden (Motivation in Kap. 4.1.2 und Ergebnisse in 4.3.2). In beiden Fällen wurde die Anwendung in LabVIEW (National Instruments, Austin, Texas, USA) programmiert und in die am BIZ (BioImaging Zentrum, Ludwig-Maximilians-Universität, Martinsried, Deutschland) entwickelte Zweiphotonen-Steuerungssoftware Colibri eingebettet (Abb. 4.11 [See13]). Die Bilderstapel, in denen die Koordinaten der Trajektorie bestimmt werden, werden zunächst in Colibri aufgenommen und dann in die jeweilige Benutzeroberfläche hinein geladen. Alle Bilder werden mit 16 bit im tiff-Format abgespeichert. Soll ein ganzer Bilderstapel aufgenommen werden, können diese in einem *Multitiff*, also in einer Datei, die mehrere Bilder enthält, zusammengefasst werden. Jede tiff- oder Multitiff-Datei enthält Metadaten des Scans, wie beispielsweise den Befehlssatz, durch den er erzeugt wurde, die Vergrößerung des benutzten Objektivs, die z-Position der Voice Coil oder die Wellenlänge des Lasers.

Die Software zur Linientrajektorie

Die Benutzeroberfläche Durch Klick auf den Menüpunkt TRAJECTORIES in der Colibri-Oberfläche öffnet sich das entwickelte Programm (Abb. 4.12). Um es nutzen zu können, muss

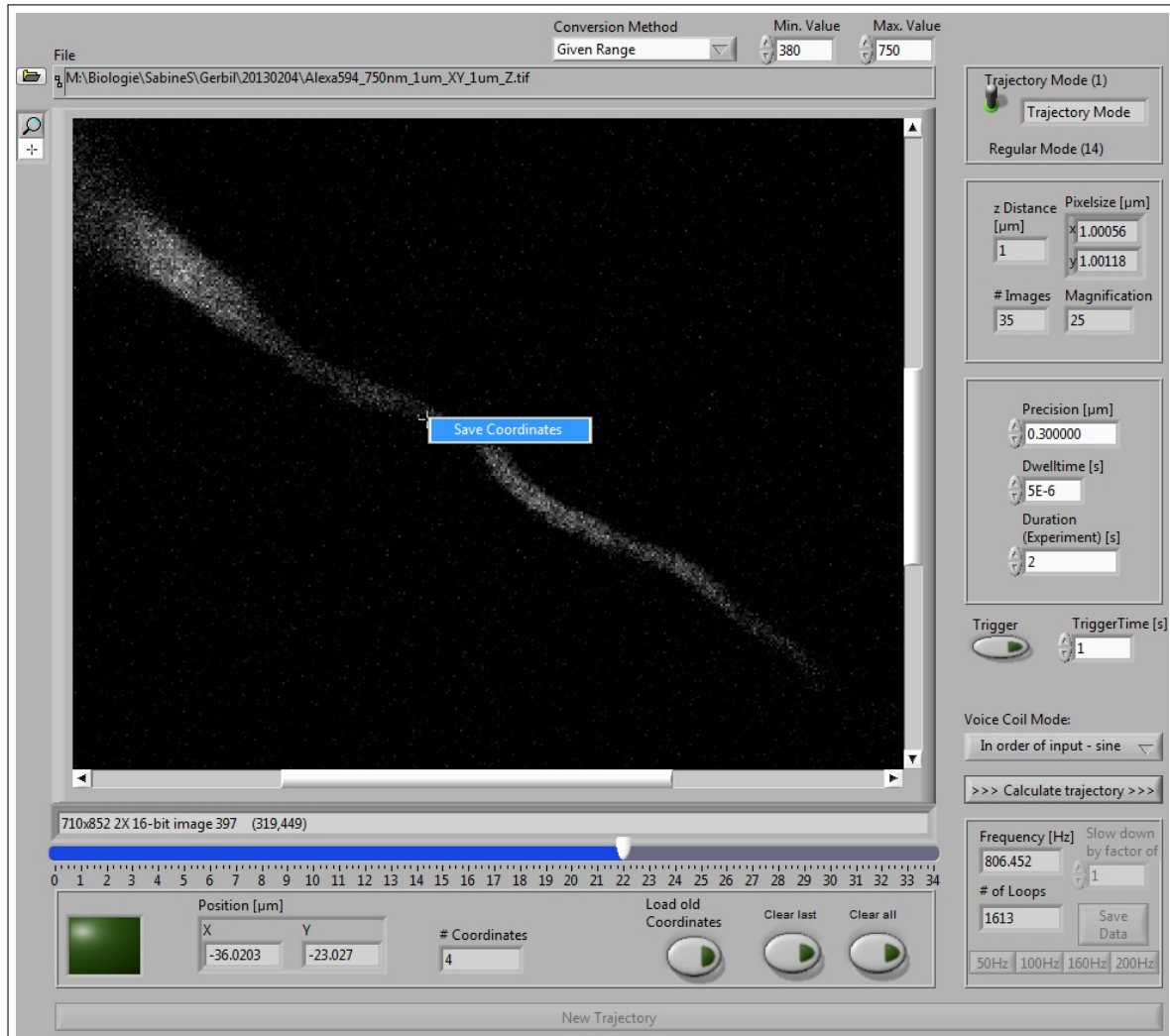


Abb. 4.12.: Benutzeroberfläche für die Ausführung von dreidimensionalen Linientrajektorien. In das Bildfenster wird der gewünschte Bildstapel geladen. Mit dem Schieberegler unter dem Bild kann in axialer Richtung durch den Stapel geblättert werden. Durch Rechtsklick können die Koordinaten eines Punktes gespeichert werden, durch den die Trajektorie laufen soll. Am rechten Rand können verschiedene Parameter wie Integrationszeit oder Dauer des Experiments eingestellt werden.

ein unmittelbar zuvor aufgenommener Bilderstapel in die Bildanzeige hinein geladen werden. Dies geschieht über einen Auswahldialog des Windows-Explorers durch Mausklick auf

die entsprechende Schaltfläche im oberen Teil der Benutzeroberfläche (längliche Box ganz oben in Abb. 4.12). Mit dem Bildstapel werden auch dessen Metadaten eingelesen. Somit ist der genaue Ort bekannt, an dem dieser Stapel aufgenommen wurde, sofern die Probe in der Zwischenzeit nicht entfernt oder verrutscht wurde. Zusätzlich kann die Pixelgröße ausgelesen werden, wie viele Bilder der Stapel enthält, welche Vergrößerung das verwendete Objektiv hatte und in welchem z-Abstand die Bilder aufgenommen wurden. All diese Informationen stehen nach dem Einlesevorgang am rechten Rand der Benutzeroberfläche (zweiter Kasten von oben in Abb. 4.12).

Helligkeit und Kontrast des Bildes können durch geeignete Wahl des `CONVERSION MODE` und dessen Parameter (oben in Abb. 4.12) erhöht werden, falls das Signal im Bild schwach ist. Durch Rechtsklick ins Bild erscheint die Wahltaste `SAVE COORDINATES`, mit der die Koordinaten dieses Bildpunktes abgespeichert werden. Hierfür werden die Pixel über die bekannte Pixelgröße, die Lage des Bildes innerhalb der Probe und die Vergrößerung des Objektivs in Ortskoordinaten im Präparat umgerechnet. Die z-Position wird aus der Nummer des Bildes innerhalb des Stapels, der Position des obersten Bildes und dem z-Abstand aller Bilder im Stapel berechnet. Die Koordinaten werden unter der Bildanzeige in μm angezeigt, die Position innerhalb des Stapels ist an der Schiebeleiste ablesbar.

Sind alle gewünschten Punkte im Stapel ausgewählt, können Integrationszeit und Dauer des Experiments festgelegt werden (rechts in Abb. 4.12). Es kann außerdem ein Trigger gesetzt werden, der gegebenenfalls nach einer gewünschten Zeit über eine Mikropipette eine elektrische Stimulation der Probe auslöst.

Es kann nun zwischen verschiedenen Modi gewählt werden, wie beispielsweise Sinusbewegungen und Dreieckbewegungen der Voice Coil. Außerdem kann hier festgelegt werden, ob die Punkte in der angegebenen Reihenfolge abgescannt werden sollen oder nicht. Für den im Rahmen dieser Arbeit präsentierten Scan entlang Dendriten wurde stets der Modus `IN ORDER OF INPUT - SINE` verwendet. Die Voice Coil fährt damit Sinuskurven, die sich im vorhergehenden Kapitel als am geeignetsten herausgestellt haben (Kap. 4.2.1). Zusätzlich werden die Punkte in der Reihenfolge der Eingabe abgefahren, und auf dem Rückweg in genau entgegengesetzter Reihenfolge. Andere Modi ordnen die Punkte so an, dass die Hälfte

der Punkte auf dem Hinweg, die andere Hälfte auf dem Rückweg abgescannt werden.

Es ist zu beachten, dass bei Sinusbewegungen der Voice Coil in jedem Bild des Stapels immer nur ein Punkt ausgewählt werden kann, da sich der Fokus in axialer Richtung immer in Bewegung befindet. Wären pro Ebene zwei oder mehr Punkte ausgewählt, müssten sich die xy-Scanspiegel an mehreren Orten gleichzeitig befinden. In diesem Modus wird daher nur ein Punkt pro Ebene erlaubt. Bei jedem weiteren Klick wird der Benutzer durch Aufleuchten eines roten Lämpchens links unten im Bild (Leuchtfläche ist hier grün, Abb. 4.12) hierauf aufmerksam gemacht.

Sind nun alle Parameter bestimmt und der gewünschte Modus eingestellt, wird die Berechnung der Trajektorie durch Mausklick auf >>> CALCULATE TRAJECTORY >>> gestartet. Im Anschluss kann die Geschwindigkeit des Scans auf bestimmte voreingestellte Frequenzen zwischen 50 Hz und 200 Hz gesetzt werden (unten rechts in Abb. 4.12).

Ausgelöst wird die Trajektorie dann im Hauptfenster von Colibri durch einen Klick auf die Taste SINGLE. Dieser kann mehrmals wiederholt werden. Soll eine neue Trajektorie gelegt werden, muss diese wieder in der Benutzeroberfläche des Trajektorienscans konstruiert werden. Hierzu betätigt man die breite Taste ganz unten mit der Aufschrift NEW TRAJECTORY. Somit können erneut Punkte im Bildstapel ausgewählt werden, die zu einer Trajektorie zusammengefügt werden sollen. Es können auch die Punkte des vorherigen Scans geladen werden, manche davon gelöscht oder durch weitere ergänzt werden (siehe den unteren Kasten mit den Druckknöpfen LOAD OLD COORDINATES, CLEAR LAST oder CLEAR ALL).

Sollen die Koordinaten der Trajektorie für eine spätere Auswertung gespeichert werden, kann über einen Klick auf den SAVE-Knopf eine Textdatei angefordert werden. Diese wird dann automatisch im Ordner des verwendeten Bildstapels erstellt. Der SAVE-Knopf befindet sich ganz rechts unten in Abb. 4.12 und ist ausgegraut, da er erst aktiv wird, wenn eine Trajektorie erstellt wurde.

Schließlich sei bemerkt, dass der Kippschalter oben rechts zum Fahren der Trajektorien auf TRAJECTORY MODE (1) stehen muss. Dies wechselt auf die digitale Schnittstelle TMSI (Temporary Mobile Subscriber Identity), womit die Befehle an die Voice Coil in höherer Taktung geschickt werden können. Der Wechsel auf die TMSI sollte bei Versuchsbeginn und noch vor

Aufnahme des Bilderstapels erfolgen, da die Voice Coil den geschlossenen Regelkreis hierbei vorübergehend verlässt und alle z-Positionen hinterher leicht verändert sein können.

Die Programmstruktur Nach Bestimmung der Punkte für die Trajektorie werden diese in Positionen der Voice Coil, bzw. Winkelstellungen der Scanspiegel umgerechnet. Durch die in Kap. 4.2.1 berechneten Höchstbeschleunigungen wird dann ermittelt, mit welcher Frequenz die gewünschte Linientrajektorie gefahren werden kann. Hierbei ist eine gewisse Genauigkeit (siehe Eingabefeld PRECISION im dritten Kasten von oben in Abb. 4.12) vorgegeben, mit der ein Punkt erreicht werden muss. Dieser ist je nach Größe der Struktur zu wählen. Bei Dendriten, die nur einige Mikrometer dick sind, ist eine Genauigkeit von unter einem Mikrometer erstrebenswert. Falls diese Genauigkeit nicht erreicht werden kann, werden die vorgegebenen Zeitabstände zwischen den Punkten so lange vergrößert, bis dies der Fall ist. Oftmals werden die Punkte dann jedoch trotzdem nicht mit der gewünschten Genauigkeit erreicht. Der Grund dafür ist die besonders bei hohen Frequenzen große Abweichung zwischen Soll- und Istwert der Voice Coil, wie in Kap. 4.2.1 gezeigt. Für ein befriedigendes Ergebnis müssen daher die Sollwerte der z-Koordinaten derart skaliert werden, dass der Befehl genau zur gewünschten Amplitude führt. Hierfür wurden Trajektorienscans mit Sinusbewegungen generiert und deren Korrekturfaktoren zur Skalierung in Abhängigkeit von Frequenz und Hub vermessen. Diese unterscheiden sich leicht von den Faktoren, die bei Sinusbewegungen des herstellereigenen Wellengenerators gemessen wurden (siehe Kap. 4.2.1). Die Messungen werden im Ergebnisteil präsentiert (Kap. 4.3.1).

Zielführender ist es also, eine Trajektorie zunächst mit niedrigerer Genauigkeit berechnen zu lassen, dann eine Frequenz vorzugeben und die z-Koordinaten entsprechend der Korrekturfaktoren zu skalieren. Es werden also - zumindest bei hohen Frequenzen - Befehle mit zu großer Amplitude geschickt, um die eigentlich gewünschte Amplitude zu erreichen. Auch die Zeitdifferenz zwischen Befehl und Ausführung des z-Triebs wird in der entwickelten Software berücksichtigt. Die Befehle der Scanspiegel werden leicht zeitversetzt verschickt, um eine gemeinsame Ausführung zu erreichen.

Trajektorie aus zweidimensionalen Bildern

Die Benutzeroberfläche Direkt unter dem Menüpunkt TRAJECTORIES in der Colibri-Oberfläche befindet sich der Punkt TRAJECTORIES2D , mit dem das entwickelte Programm für einen zusammengesetzten Scan aus im Raum verteilten, zweidimensionalen Bildern (Abb. 4.13) geöffnet werden kann. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um die Änderung

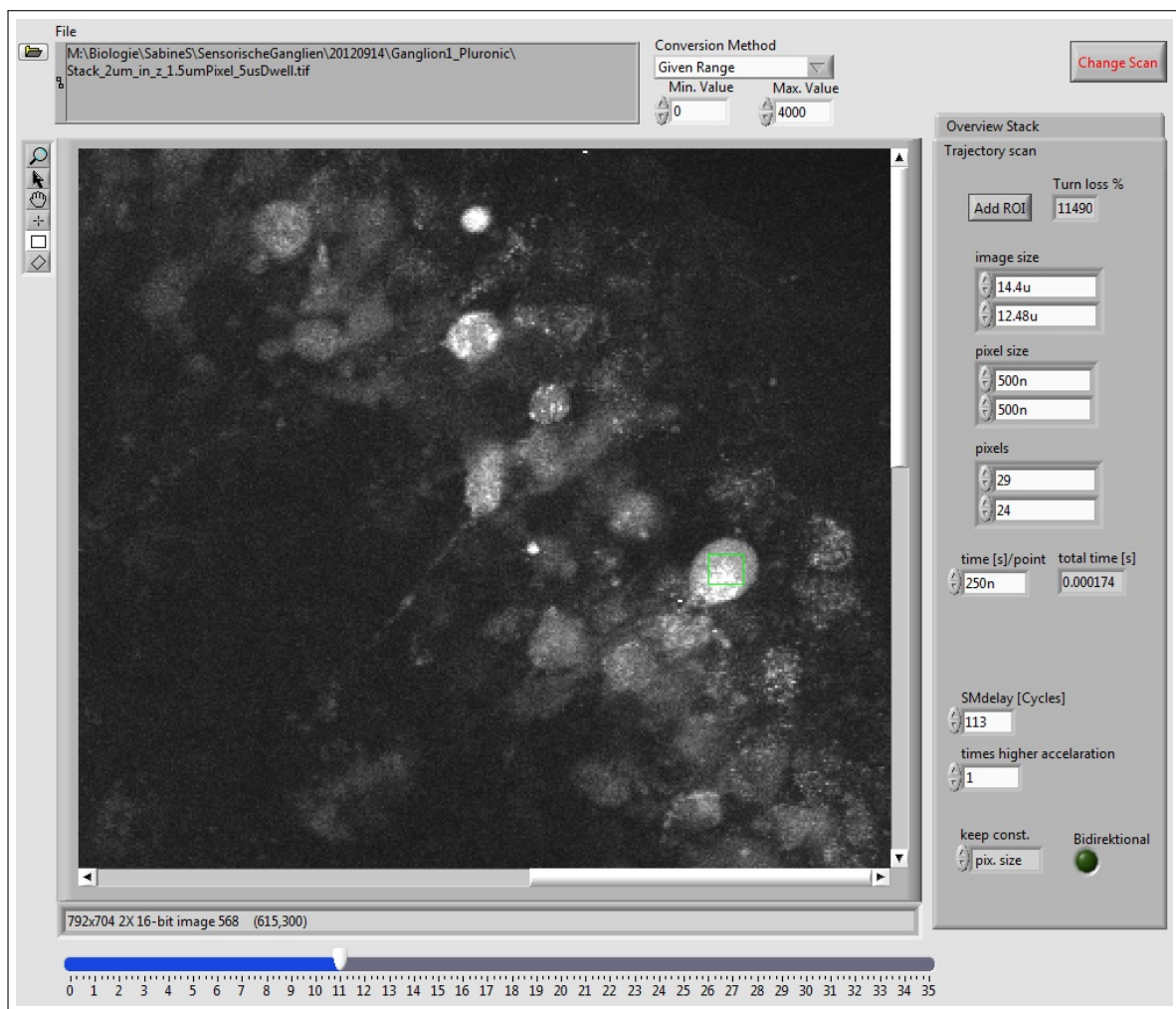


Abb. 4.13.: Benutzeroberfläche für die Bestimmung von Trajektorien, die aus mehreren zweidimensionalen Scans bestehen. In das Bildfenster wird der gewünschte Bildstapel geladen. Mit dem Schieberegler unter dem Bild kann in axialer Richtung durch den Stapel geblättert werden. Mit der Maus kann ein Rechteck aufgezogen werden (hier in grün), das abgescannt werden soll. Mit der Schaltfläche *Add ROI* kann diese zu den gewünschten zweidimensionalen Scans hinzugefügt werden, die nacheinander abgescannt werden. Am rechten Rand können verschiedene Parameter wie Integrationszeit oder Pixelgröße eingestellt werden.

des optischen Signals in einzelnen Neuronen innerhalb eines Spinalganglions bei einer Kalziumionenreaktion zu beobachten (siehe Kap. 4.3.2). Es wird dabei von einem Neuron zum nächsten gesprungen und jeweils ein zweidimensionaler Scan ausgeführt.

Auch hier wird ein unmittelbar zuvor aufgenommener Bilderstapel über einen Auswahldialog des Windows-Explorers in die Bildanzeige hinein geladen (längliche Box ganz oben in Abb. 4.13). Gleichzeitig werden relevante Informationen wie Pixelgröße, Objektivvergrößerung, Anzahl der Bilder im Stapel und ihr Abstand eingelesen. Die Eigenschaften des Bildstapels werden automatisch in entsprechende Felder im Reiter OVERVIEW STACK eingetragen (Abb. 4.13).

Im Gegensatz zum Programm der Linientrajektorien werden hier keine Punkte ausgewählt, sondern rechteckige ROIs (Regions Of Interest). Wie in Abb. 4.13 zu sehen, kann man damit eine Fläche innerhalb eines Neurons markieren, die dann Teil des Trajektorienscans wird. Rechts neben der Bildanzeige können die exakte Bildgröße, die Pixelgröße und die Integrationszeit festgelegt werden. Mit Klick auf den Schalter ADD ROI wird diese rechteckige Fläche dem Scan hinzugefügt. Sind alle relevanten Flächen ausgewählt, wird das Scanprotokoll per Mausklick auf den Knopf CHANGE SCAN an Colibri übertragen. Dort wird es über die Schaltfläche SINGLE ausgelöst. Eine Bilddatei enthält dann untereinander die Scans aller ausgewählten rechteckigen Flächen. Bei wiederholtem Scan durch Drücken der CONTINUOUS -Taste in Colibri können diese in einem Multitiff zusammengefasst werden.

Für diese Art des Scans muss wie bei der Linientrajektorie auf die digitale Schnittstelle TMSI umgeschaltet werden, im besten Fall auch bereits vor Aufnahme des Bildstapels.

Die Programmstruktur Über die Metadaten sind die Koordinaten des Bildstapels bekannt und die der ROIs können folglich daraus berechnet werden. Die bestimmten Bilder werden immer in Reihenfolge der Eingabe angeordnet. Es gibt hier anders als bei der Linientrajektorie keine verschiedenen Modi. Alle zweidimensionalen Scans werden im Abstand von 3 ms ausgeführt, um der Voice Coil genügend Zeit zu geben, in die nächste Ebene zu springen.

Soll der Scan nun zum Beobachten des optischen Signals nach der Zerstörung eines benach-

barten Neurons genutzt werden, muss dies in ein weiteres kleines Programm zum Erstellen dieses Protokolls eingebunden werden. Das manuelle Umschalten der Parameter zwischen Zerstörung und Messung würde zu lange dauern, so dass Teile der Reaktion nicht mehr sichtbar wären.

Da für die Zerstörung eine weitaus höhere Laserintensität nötig ist als zum Messen des Signals, gibt es nun zwei Möglichkeiten für ein solches Protokoll. Es kann entweder die Leistung des Lasers herunter geregelt werden, um dann zum Trajektorienscan überzugehen, oder diese wird beibehalten und die Integrationszeit wird zum Messen extrem klein gewählt. Letztere Möglichkeit erlaubt ein deutlich schnelleres Schalten zwischen Zerstörung und Messung, da eine Änderung der Laserleistung einige Sekunden in Anspruch nimmt.

Beide Benutzeroberflächen zur Konstruktion dieser Protokolle sind in Anhang D zu finden. Erstellte Trajektorien- bzw. Zerstörungsscans können dort hinein geladen und anschließend verknüpft werden.

4.2.3. Präparation der Proben und Versuchsvorbereitungen

Hirnschnitte der Wüstenrennmaus

Die Hirnschnitte wurden von einer anderen Arbeitsgruppe¹ im Rahmen einer Zusammenarbeit präpariert und für die Trajektorienscans bereitgestellt. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den geltenden Gesetzen durchgeführt und die Versuchsprotokolle entsprachen den Regeln der Regierung Oberbayern gemäß dem Deutschen Tierschutzgesetz (AZ 55.2-1-54.2531.8-211-10). Die Schnitte stammen aus Mongolischen Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*) im Alter von etwa 10 bis 15 Tagen. Die Tiere wurden unter Isofluran-Betäubung enthauptet und das Gehirn vorsichtig entnommen. Es wurden anschließend mit einem VT1000S Vibratom (Leica) in eisgekühlter Präparierlösung 200 µm dicke Schnitte, die die gewünschte Region des akustischen Systems enthalten, hergestellt. Die Lösung enthält 50 mM Sucrose, 25 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄,

¹Sarah Berner, Arbeitsgruppe Felix Felmy, Abteilung Neurobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Großhaderner Straße 2, D-82152 Planegg-Martinsried

4. Trajektorienscan

3 mM MgCl_2 , 0,1 mM CaCl_2 , 25 mM Glukose, 0,4 mM Ascorbinsäure, 3 mM myo-Inosit, und 2 mM Na-Pyruvat in zweifach destilliertem Wasser (mit einem pH-Wert von 7,4 durch Sättigung mit Carbogen, bestehend aus 95% O_2 und 5% CO_2 ; alle Chemikalien von Sigma). Die Schnitte wurden anschließend für 45 Minuten bei 36 °C in Experimentierlösung inkubiert (diese unterschied sich geringfügig von der Präparierlösung: 125 mM NaCl, keine Sucrose, 2 mM CaCl_2 , und 1 mM MgCl_2) und ebenfalls mit Carbogen beblubbert. Die Experimente fanden innerhalb von 4 bis 5 Stunden nach der Präparation statt. Die Schnitte wurden währenddessen ununterbrochen mit frischer Experimentierlösung perfundiert.

Der Schnitt wurde mit einem Gitter unter dem Objektiv fixiert, um Bewegungen und Wellen zu vermeiden. Die mediale obere Olive (MSO) wurde im Weitfeldmodus identifiziert.

Um eine einzelne Zelle zu färben und später auch zu stimulieren, wurde mit der *Patch-Clamp-Technik* gearbeitet [Neh78]. Mit dieser Methode lassen sich kleinste Strom- oder Spannungsänderungen der Zelle in akuten Hirnschnitten nachweisen [Edw89]. Hierfür wurden mit einem DMZ Universal Puller (Zeitz Instruments, Augsburg, Deutschland) Mikropipetten aus Borosilikatglas (Harvard Apparatus Ltd., Edenbridge, Kent, UK) hergestellt. Damit hatten die Mikroelektroden einen Widerstand von typischerweise 2,8 M Ω – 3,5 M Ω .

Die Pipette wird unter Sicht auf die Zelle gesetzt. Über ein Mundstück wird ein Stück der Zellmembran angesaugt. Hierdurch entsteht ein elektrischer Widerstand im Gigaohm-Bereich zwischen der Lösung innerhalb der Pipette, in der auch die Elektrode steckt, und dem externen Bad, wenn die Membran die Pipettenspitze umschließt und abdeckt [Ham81]. Durch kurzes Ansaugen kann dieses Membranstück zerrissen werden, so dass ein Zugang zur Zelle geschaffen ist. Die Lösung in der Pipette (135 mM Cs-Gluconat, 10 mM Hepes, 20 mM Tetraethylammonium (TEA)-Cl, 3,3 mM MgCl_2 , 2 mM Na_2 -ATP, 0,3 mM Na-GTP, 3 mM Na_2 -Phosphocreatin, 30 μM Oregon Green BAPTA-1, reguliert auf einen pH-Wert von 7,2 mit CsOH), die auch den Farbstoff enthält, gelangt so ins Zellinnere und ersetzt das Zytosol. Für die Visualisierung von Kalziumioneneinstrom in den Dendriten wurde der Ca^{2+} -Indikator Oregon Green BAPTA-1 (OGB-1) (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) benutzt. Es handelt sich hierbei um einen hoch-affinen Ca^{2+} -Indikator mit einer Dissoziationskonstante von $K_d = 195 \pm 5$ nM. Gleichzeitig wurde ein weiterer Farbstoff zugesetzt, um die

Struktur besser sichtbar zu machen, da OGB-1 erst durch Kontakt mit freien Kalziumionen stärker fluoreszent wird. Hierfür wurde Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) gewählt, da es sich mit der selben Wellenlänge anregen lässt wie OGB-1.

Im „whole-cell“-Modus wurde das Membranpotential auf -60 mV gehalten („Voltage-clamp“). Elektrophysiologische Messungen wurden nicht gemacht. Der Zugang zur Zelle war jedoch zur Färbung und für die elektrische Stimulation über die Elektrode wichtig. Für die Messung mit dem hierfür entwickelten Trajektorienscan wurden 8 kurze Pulse zu je 3 nA mit 100 Hz gegeben. Diese waren über die Software des Mikroskops getriggert. Die Reaktion konnte mit einem Trajektorienscan auf dem Dendriten der MSO-Zelle nachgewiesen werden (siehe Kap. 4.3.2).

Spinalganglien des Hühnerembryos

Die Vorbereitung und Präparation der Ganglien wurde von einer Kollegin durchgeführt². Vor Beginn der Präparation des Hühnerembryos mussten zunächst die Zellkulturschälchen, in denen die Ganglien später inkubiert werden, vorbereitet werden. Die 30 µl-Mikrowells (µ-Slide 18 well, ibidi, Verona, Wisconsin, USA) wurden für 60 Minuten in Ethanol gereinigt. Über Nacht wurden sie in einem Weinklimaschrank (WK 1806, Liebherr, Biberach, Deutschland) mit 25 µl Polylysin (0,383 mMol/l Poly-D-Lysin Hydrobromid in demineralisiertem Wasser) beschichtet. Dies gewährleistet, dass die Laminin-Beschichtung im Anschluss gut hält. Die Schälchen wurden dann zweimal mit je 50 µl PBS und destilliertem Wasser gespült, luftgetrocknet und für 30-40 Minuten unter UV-Licht (HNS 30 OFR, Osram, München, Deutschland) sterilisiert. Unmittelbar vor Verwendung wurden die Schälchen mit 25 µl Laminin (Hoffmann La Roche AG, Basel, Schweiz, 10 µg/ml in HBSS, Hank's Balanced Salt Solution ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , Invitrogen) für zwei Stunden im Zellkulturschrank (Modell 3121, Forma Scientific, Ohio, USA) inkubiert und dadurch beschichtet. Laminin wirkt als Nährboden für die Ganglien. Sie wurden anschließend zweimal mit HBSS gewaschen.

Die bestellten Eier (Lohmann Tierzucht, Cuxhaven, Deutschland) wurden bis Brutbeginn im

²Anja Werner, BioImaging Zentrum, Ludwig-Maximilians-Universität München, Großhaderner Straße 2, D-82152 Planegg-Martinsried

Weinklimaschrank bei 16 °C gelagert. In einem Eierbrüter (Hova, Turbofan-70, bezogen über Lippische Kunstbrut Handel mit Brutmaschinen GmbH, Lemgo, Deutschland) wurden sie bis zum elften Entwicklungstag (E11) bei 37 °C und etwa 70% Luftfeuchtigkeit bebrütet. Die Präparation erfolgte anschließend unter sterilen Bedingungen in einer Reinluftbank (BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland). Das Ei wurde vorsichtig am stumpfen Pol geöffnet, die innere Eimembran zerrissen und der Embryo in eine Petrischale gelegt. Der Kopf wurde abgetrennt und der Körper zur weiteren Präparation unter einem Binokular (Olympus SZX 90, Olympus, Tokio, Japan) mit einer Kaltlichtquelle (KL1500 electronics, Schott, Mainz, Deutschland) mit Schwanenhalslichtleitern platziert.

Zunächst musste der Bauch des Embryos mit zwei Pinzetten geöffnet und das noch schlagende Herz herausgenommen werden. Anschließend wurden alle weiteren Organe des Bauchraums entfernt. Während der gesamten Präparation wurde regelmäßig mit raumtemperiertem HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , bezogen über Invitrogen) gespült, um Blut und Gewebereste zu entfernen. Es wurden nun die sympathischen Nervenstränge entlang der Wirbelsäule und das umliegende Bindegewebe abgetrennt, so dass die Spinalganglien sichtbar wurden. Diese wurden von ihren Nervensträngen abgetrennt und in eine vorbereitete Zellkulturschale gelegt. Diese enthielt 25-30 µl, auf 37 °C vorgewärmtes, Zellkulturmedium, bestehend zu 90% aus DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen) und zu 10% aus FCS (Fötales Kälberserum, Invitrogen). Dem Medium war Antibiotikallösung (100 µl/10 ml, Zusammensetzung: 6,86 mMol/l Streptomycinsulfat und 17,42 mMol/l Penicillin G in physiologischer Kochsalzlösung, aliquotiert zu 120 µl) und NGF (2,5 µl/10 ml, Zusammensetzung: 1 µg 7s Nerve Growth Factor in 10 µl BSA-Lösung [Bovine Serum Albumin, 5 mg/ml in PBS], alles bezogen von Invitrogen) zugesetzt.

Um das Anwachsen der Neurite auf dem Schälchen zu erleichtern, wurde das herauspräparierte Ganglion von weiterem umgebendem Bindegewebe und Nervensträngen befreit. Die Ganglien wurden dann einzeln mittig in je ein Loch der Mikrowellplatte mit 25 µl vorgewärmtem und CO_2 -gesättigtem Zellkulturmedium gelegt. Sie wurden schließlich für ca. 24 Stunden in einem Zellkulturschrank bei 37 °C, 90% Luftfeuchtigkeit und 7,5% CO_2 inkubiert, bis sich neue Neuriten gebildet hatten, die das Ganglion auf dem Schälchenboden fixieren.

Die Färbung mit dem Ca^{2+} -Indikator Fluo3-AM (Invitrogen) erfolgte unmittelbar vor dem Versuch durch Zugabe ins Zellkulturmedium. Da Fluo3 als Salz die Zellmembran nicht passieren kann, wird sein Acetoxymethylester-Derivat (AM) benutzt. Das Derivat ist nicht fluoreszent. Der Ester wird in der Zelle von Esterasen hydrolysiert und durch Bindung an freies Ca^{2+} in der Zelle erhöht sich die Intensität der Fluoreszenz von Fluo3. Die Dissoziationskonstante bei gebundenem Ca^{2+} beträgt $K_d = 325 \text{ nM}$.

Es wurde eine 1:1-Mischung aus einer Stammlösung mit 1 mM Fluo3 in trockenem DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich) und einer Pluronic-Lösung für eine bessere Membrandurchlässigkeit (20% Gewicht/Volumen Pulver auf DMSO unter Heizen verrühren, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) hergestellt. Durch Zugabe von 0,6 μl dieser Mischung in 30 μl Medium wurden 10 μM im Bad erreicht.

4.3. Ergebnisse

4.3.1. Positioniergenauigkeit der Voice Coil im Trajektorienscan

Sinusbewegungen

Wie in Kap. 4.2.1 beschrieben, beträgt die Amplitude einer Sinuskurve der Voice Coil je nach Frequenz und Hub zwischen 15% und 115% des eigentlich gewünschten Werts. Für die Trajektorienscans muss der Sollwert daher in der in Kap. 4.2.2 beschriebenen Software um einen entsprechenden Faktor vergrößert oder verkleinert werden. So können die vom Benutzer definierten Punkte entlang der Trajektorie mit einer hohen Genauigkeit erreicht werden. Die durch die Software generierten Befehle ergeben damit Sinuskurven, die die geforderte Amplitude mit einer Abweichung von höchstens $\pm 0,5 \mu\text{m}$ erreichen (Anhang C.4). In Anbetracht der Dimensionen des Fokus und der Struktur im Präparat erfüllt dies die Anforderungen des Experiments: In axialer Richtung beträgt die Größe des Zweiphotonenanregungsvolumens etwa 1 μm (siehe Kap. 2.2); der Durchmesser der zu untersuchenden Dendriten liegt im Bereich von 2-6 μm (Kap. 4.1.1). Auch bei einer geringen Abweichung von 0,5 μm von der benutzerbestimmten Trajektorie wird daher zuverlässig das Signal innerhalb des Dendriten

aufgenommen.

Im Gegensatz zu den in Kap. 4.2.1 beschriebenen Sinuskurven (via Wellengenerator und serielle Schnittstelle) werden die Befehle hier per digitale Schnittstelle (TMSI) an den z-Trieb gesendet. Die Korrekturfaktoren für die Amplitude und die Zeitdifferenz zwischen Befehl und Ausführung sind daher nicht direkt aus den Tabellen in Kap. 4.2.1 abzulesen. Sie wurden unter Verwendung der entwickelten Software für Trajektorienscans erneut gemessen.

Auf eine Messung bei 200 Hz wurde verzichtet, da bereits bei den Vorversuchen zu erkennen war, dass Amplituden von mehr als etwa 2 μm auch bei sehr großen Sollwerten nicht zu erreichen sind. Zusätzlich ist die Form bereits bei kleineren Amplituden zunehmend verändert, so dass kein Sinus mehr zu erkennen ist und die Kurve daher nicht mehr berechenbar ist.

Auch eine Trajektorie mit 150 Hz wiederholt abzufahren ist nicht möglich - in diesem Fall aber aus rein rechnerischen Gründen. Die Zeit für eine Schleife betrüge in diesem Fall $t = \frac{1}{150\text{Hz}} = 0,00\overline{6}s$ - ein Wert, der nicht aufgeht. Da auf eine Implementierung von Trajektorien bei 200 Hz verzichtet wurde, wurde die Option bei 150 Hz durch eine geringfügig schnellere bei 160 Hz ersetzt. Dies ergibt eine Schleifendauer von $t = \frac{1}{160\text{Hz}} = 0,00625s$.

Tabelle 4.5 fasst die verwendeten Verstärkungsfaktoren für Amplituden von 0,5 μm bis 10 μm bei verschiedenen Frequenzen zusammen, die zu den in Anhang C.4 gezeigten Messergebnissen führen. In Tabelle 4.6 sind die zugehörigen Zeitdifferenzen zwischen Befehl und Ausführung abzulesen. Diese Werte wurden auch für die in Kap. 4.3.2 beschriebenen Experimente in biologischem Gewebe verwendet.

Abb. 4.14 zeigt eine durch die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Software generierte Sinuskurve bei 160 Hz mit einer Amplitude von 0,5 μm . Der Sollwert musste in diesem Fall um den Faktor 2,5 verstärkt werden, um die gewünschte Amplitude zu erreichen. Da die z-Position der Voice Coil nur an einigen Punkten für entsprechend wenige Zeitpunkte festgelegt wird, ist der Graph des Sollwerts keine exakte Sinuskurve. Durch die Trägheit der Masse wird sie jedoch verschliffen, so dass die Messkurve sinusförmig ist.

Bei 160 Hz konnten bei Amplituden bis 2,5 μm sinusförmige Kurven gemessen werden. Ab einer Amplitude von 3,75 μm war die Form der Kurve jedoch verändert und nicht mehr vorhersagbar. Für Experimente, die größere Amplituden erfordern, sind daher nur Messungen

mit einer Frequenz von 50 Hz oder 100 Hz sinnvoll.

Im Experiment wurden Amplituden, die zwischen den hier gemessenen liegen, auf die nächstliegende gerundet, um den entsprechenden Korrekturfaktor zu ermitteln.

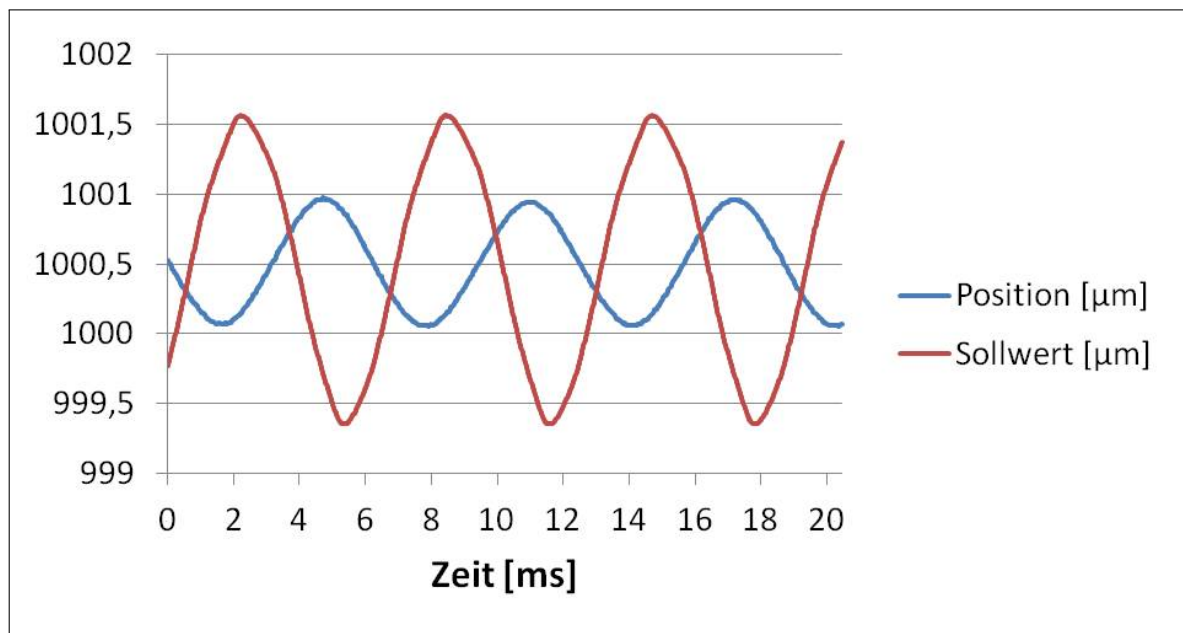


Abb. 4.14.: Positioniergenauigkeit der Voice Coil im Trajektorienscan am Beispiel einer Sinuskurve bei 160 Hz. Die Amplitude beträgt $0,5 \mu\text{m}$. Der Sollwert der Amplitude wurde hierfür um den Faktor 2,5 verstärkt. Die zeitliche Differenz zwischen Befehl und Ausführung beträgt 2,46 ms.

Amplitude	50 Hz	100 Hz	160 Hz
$0,5 \mu\text{m}$	1,1	1,25	2,5
$1,25 \mu\text{m}$	1,0	1,0	2,5
$2,5 \mu\text{m}$	1,0	1,0	2,7
$3,75 \mu\text{m}$	1,0	1,0	2,86
$5 \mu\text{m}$	1,0	1,0	—
$6,25 \mu\text{m}$	1,0	0,9	—
$7,5 \mu\text{m}$	1,0	0,9	—
$8,75 \mu\text{m}$	1,0	0,9	—
$10 \mu\text{m}$	1,0	1,0	—

Tabelle 4.5.: Faktoren zur Verstärkung der Amplitude bei Sinusbewegungen der Voice Coil. Die Verstärkungsfaktoren wurden experimentell ermittelt. Der Sollwert der Amplitude wird mit dem Verstärkungsfaktor multipliziert, um den tatsächlichen Wunschwert zu erhalten.

Amplitude	50 Hz	100 Hz	160 Hz
0,5 μm	1,66	1,66	2,46
1,25 μm	1,86	1,86	2,56
2,5 μm	1,86	1,86	2,56
3,75 μm	1,86	1,86	2,56
5 μm	1,86	1,86	—
6,25 μm	1,86	1,86	—
7,5 μm	1,86	1,86	—
8,75 μm	1,86	1,86	—
10 μm	1,86	1,86	—

Tabelle 4.6.: Zeitdifferenzen zwischen Befehl und Ausführung bei Sinus- und Sprungbewegungen der Voice Coil beim Trajektorienscan in Millisekunden. Die Werte der Zeitverzögerung zwischen Befehl und Ausführung der Kurve sind hier für alle gemessenen Frequenzen und Amplituden aufgelistet.

Sprungbewegungen

Analog zu den Sinuskurven wurden auch Sprünge der Voice Coil erneut gemessen (Anhang C.5), um die Zeitverzögerung zwischen Befehl und Ausführung, sowie die Korrekturfaktoren des Hubs bei diversen Frequenzen bei Verwendung der in Kap. 4.2.2 beschriebenen Software zu charakterisieren. Die Zeitdifferenzen unterscheiden sich hierbei nicht von den bei Sinuskurven gemessenen (siehe Tab. 4.6), wobei der Hub eines Sprungs der doppelten Amplitude der Sinuskurve entspricht.

Obwohl für das in Kap. 4.3.2 beschriebene Experiment nur niedrige Frequenzen und kleine Hübe im Bereich vom Durchmesser eines Neurons nötig sind, wurden der Vollständigkeit halber auch die Parameter größerer Sprünge gemessen. Ziel ist es ja, die entwickelte Methode möglichst vollständig zu beschreiben, damit Anwendungsmöglichkeiten in späteren Experimenten abgeschätzt werden können.

Die Sprünge fielen in den meisten Fällen zu groß aus, so dass sie durch die in Tab. 4.7 zusammengefassten Faktoren korrigiert werden mussten. Mit diesen Parametern konnten die in Anhang C.5 dargestellten Bewegungen bei 50 Hz und 100 Hz generiert werden. Bei 160 Hz wurde der Sprung bereits bei einem Hub von nur 1 μm derart stark verschliffen, dass auf weitere Messungen bei dieser Frequenz verzichtet wurde. Auch bei 50 Hz und 100 Hz ergeben sich keine exakt stabilen Plateaus. In Abb. 4.15 wird dies beispielhaft am 10 μm Sprung bei

50 Hz gezeigt. Auch die zeitliche Differenz von 1,86 ms zwischen Befehl und Ausführung ist in dieser Abbildung deutlich zu erkennen. Im Fall der Anwendung in Neuronen eines Spinalganglions mit Durchmessern von ca. 10 μm sind Abweichungen jedoch in gewissem Maße tolerierbar. Zudem sind im Experiment aufgrund der Dauer der zweidimensionalen Scans keine hohen Frequenzen möglich. Die Ausführung der Sprünge ist folglich versuchsbedingt ohnehin sauberer.

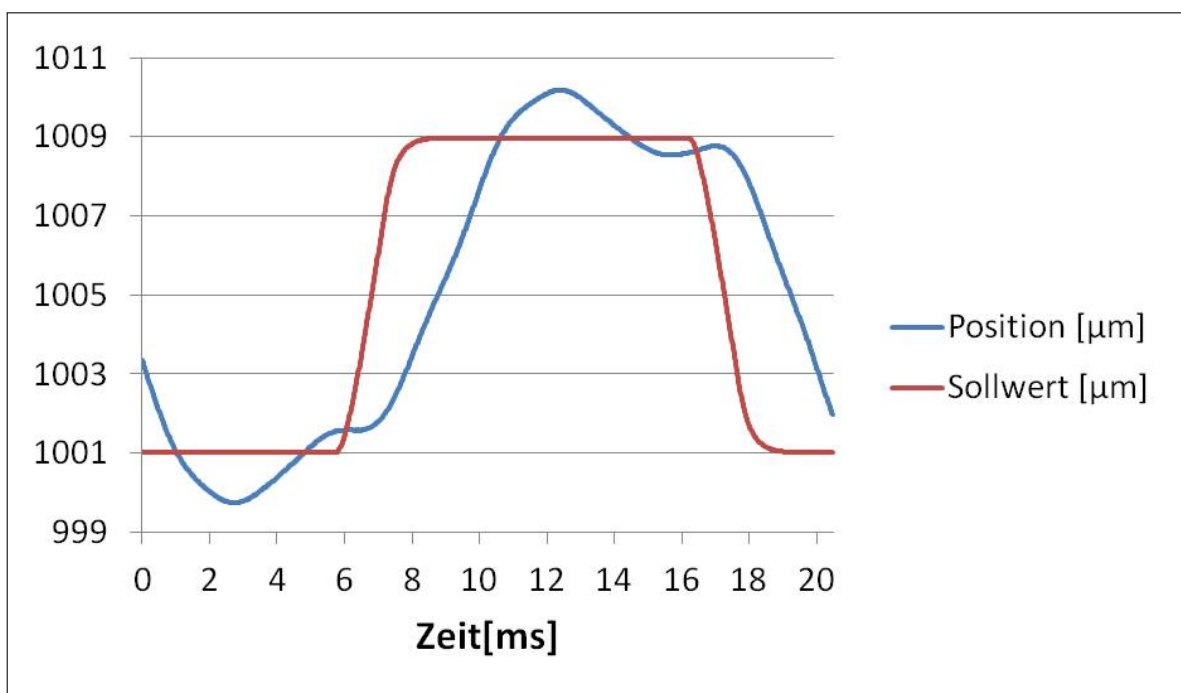


Abb. 4.15.: Positioniergenauigkeit der Voice Coil am Beispiel eines 10 μm Sprungs bei 50 Hz. Der Sollwert der Amplitude wurde hierfür um den Faktor 0,8 abgeschwächt. Die zeitliche Differenz zwischen Befehl und Ausführung beträgt 1,86 ms.

4.3.2. Kalziummessungen in biologischem Gewebe unter Verwendung des Trajektorienscans

Schließlich konnte gezeigt werden, dass der Trajektorienscan sowohl an Dendriten in der MSO von Wüstenrennmäusen im akuten Hirnschnitt als auch in Neuronen in Spinalganglien des Haushuhns mit hoher zeitlicher Auflösung Kalziumionenreaktionen detektieren kann.

Hub	50 Hz	100 Hz
1 μm	1,2	1,2
2,5 μm	0,9	0,9
5 μm	0,9	0,8
7,5 μm	0,9	0,8
10 μm	0,8	0,8
12,5 μm	0,9	0,8
15 μm	0,9	0,8
17,5 μm	0,9	0,7
20 μm	0,9	0,7

Tabelle 4.7.: Faktoren zur Korrektur der Amplitude bei Sprungbewegungen der Voice Coil. Die Korrekturfaktoren wurden experimentell ermittelt. Der Sollwert des Hubs wird mit dem Verstärkungsfaktor multipliziert, um den tatsächlichen Wunschwert zu erhalten.

MSO-Zellen in Hirnschnitten der Wüstenrennmaus

Abb. 4.16 zeigt ein Zweiphotonenbild einer MSO-Zelle. Die Pixelgröße beträgt 1 μm , sowohl in x- als auch in y-Richtung. Die Abbildung ist eine z-Projektion aus 12 Einzelbildern im Abstand von je 500 nm. Der Bildstapel umfasst damit ein Volumen mit 5,5 μm Dicke in axialer Richtung. Die Zelle ist mit dem Strukturfarbstoff Alexa 488 und dem Ca^{2+} -Indikator OGB-1 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) gefärbt. Beide Farbstoffe können bei 780 nm mit zwei Photonen angeregt werden. In der oberen Hälfte des Bildes ist die Patchpipette zu sehen, die aufgrund der hohen Farbstoffkonzentration stark leuchtet, sowie der Zellkörper. Von diesem ausgehend wurde der Dendrit über ca. 200 μm Länge mit 100 Hz abgescannt. Dies bedeutet jedoch, dass der Mittelteil des Dendriten mit 200 Hz abgescannt wird, da die Trajektorie auf dem Hin- und Rückweg die selben Koordinaten abscannt. Lediglich die beiden Wendepunkte werden mit dem Laserfokus je genau 100 mal pro Sekunde erreicht. In Abb. 4.17 ist das optische Signal eines Trajektorienscans zu sehen. Da eine Zeile dem Hin- und Rückweg auf dem Dendriten entspricht, ist das resultierende Bild symmetrisch. Der Dendrit wurde in diesem Fall 4 s lang mit einer Frequenz von 100 Hz abgescannt. Eine Zeile des Bildes entspricht somit dem Ort auf dem Dendriten, der sich in der Mitte umkehrt. Eine Spalte hingegen zeigt die zeitliche Entwicklung eines Punktes auf dem Dendriten. Abb. 4.17 ist das Resultat aus zwei aufeinanderfolgenden Messungen, die anschließend gemittelt wur-

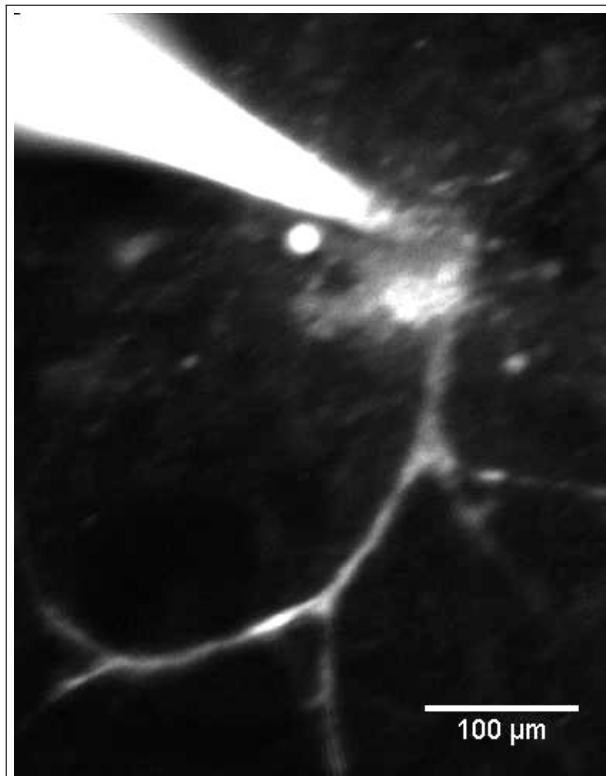


Abb. 4.16: Dendrit einer gepatchten MSO-Zelle. Die Abbildung ist eine z-Projektion aus 12 Einzelbildern im Abstand von je 500 nm. Der Bildstapel umfasst damit ein Volumen mit 5,5 μm Dicke in axialer Richtung. Die Länge des Dendriten in der Abbildung beträgt etwa 300 μm . Die ersten 200 μm vom Zellkörper weg wurden mit 100 Hz abgescannt. Auch der Zellkörper und die Patchpipette sind zu sehen.

den. Nach 2 s wurde die Zelle über die Elektrode, die sich in der Mikropipette befindet, mit 8 kurzen Pulsen zu je 3 nA mit 100 Hz stimuliert. Es ist zu sehen, dass das optische Signal als Reaktion auf die Pulse nach etwa der Hälfte der Zeit ansteigt. Dies zeigt auch Abb. 4.18, wo der Mittelwert des Grauwerts einer jeden Zeile über die Zeit aufgetragen ist. Aufgrund von Bleichung wird das Signal zunächst schwächer, jedoch steigt es nach der Stimulation wieder um etwa 10% des Anfangswertes an.

Neurone in Spinalganglien eines Hühnerembryos

Abb. 4.19 zeigt, dass vom Benutzer bestimmte zweidimensionale ROIs (Region Of Interest) in einem Trajektorien-Scan getroffen werden können. Die Oberfläche der Software erlaubt die Auswahl der ROIs in verschiedenen Ebenen des Bilderstapels. Im resultierenden Bild sind alle 4 ausgewählten Zellen zu sehen, die über eine axiale Distanz von 18 μm verteilt waren. Ihre Abstände betrugen 5 μm , 7 μm bzw. 6 μm . Die in der Benutzeroberfläche aktuell ausgewählte ROI ist die zweite im Scan. Die Dauer eines Durchgangs - also das einmalige Abscannen al-

4. Trajektorienscan

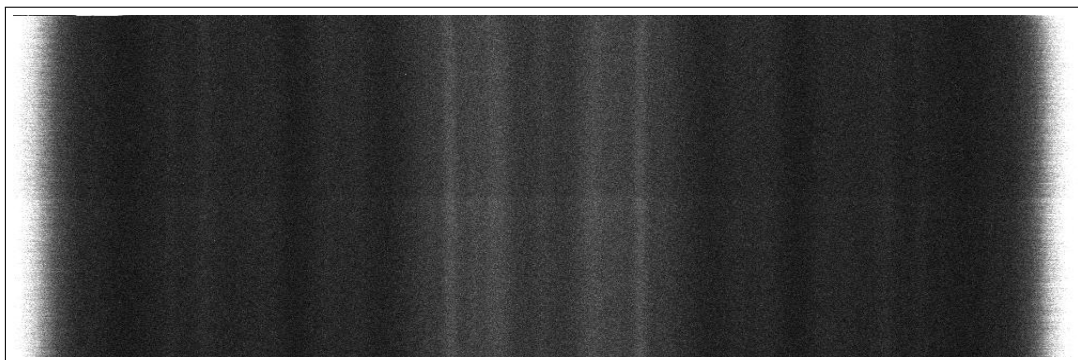


Abb. 4.17.: Trajektorienscan eines Dendriten einer gepatchten MSO-Zelle. Das Bild ist das Resultat aus 2 aufeinanderfolgenden Messungen, die anschließend gemittelt wurden. Es zeigt das optische Signal eines 4 s langen Trajektorienscans mit 100 Hz. Nach etwa der Hälfte der Zeit ist ein Anstieg des Signals zu erkennen - die Reaktion auf die elektrische Stimulation der Zelle.

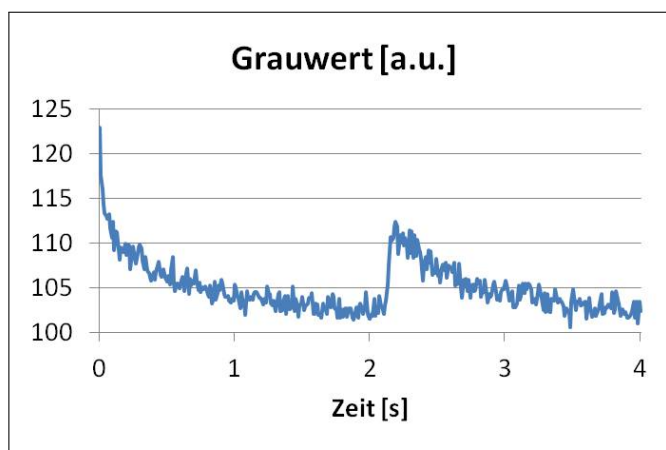


Abb. 4.18.: Kalziumionenreaktion in Dendriten einer gepatchten MSO-Zelle. Der Mittelwert des Grauwerts einer jeden Zeile aus Abb. 4.17 ist über die Zeit aufgetragen. Aufgrund von Bleichung wird das Signal zunächst schwächer, jedoch steigt es nach der Stimulation wieder um etwa 10% des Anfangswertes an.

ler 4 ROIs - betrug 0,134 s. Dieser Scan dient nur der Demonstration der Technik; bei einem regulären Versuch sind ROIs, die vollständig innerhalb der jeweiligen Zelle liegen, für eine Auswertung des optischen Signals sinnvoller. Die Zellen des Ganglions waren mit dem Ca^{2+} -Indikator Fluo3-AM (Invitrogen) gefärbt. Da kein Strukturfarbstoff beigelegt wurde, ist das Signal der Neurone zunächst relativ schwach. Für eine Bestimmung der ROIs ist es jedoch absolut ausreichend.

Um nun eine Reaktion zu erzeugen, die mit einer solchen Scantechnik effizient beobachtet werden kann, wurde ein Neuron im Ganglion mit hoher Laserintensität über den Zeitraum

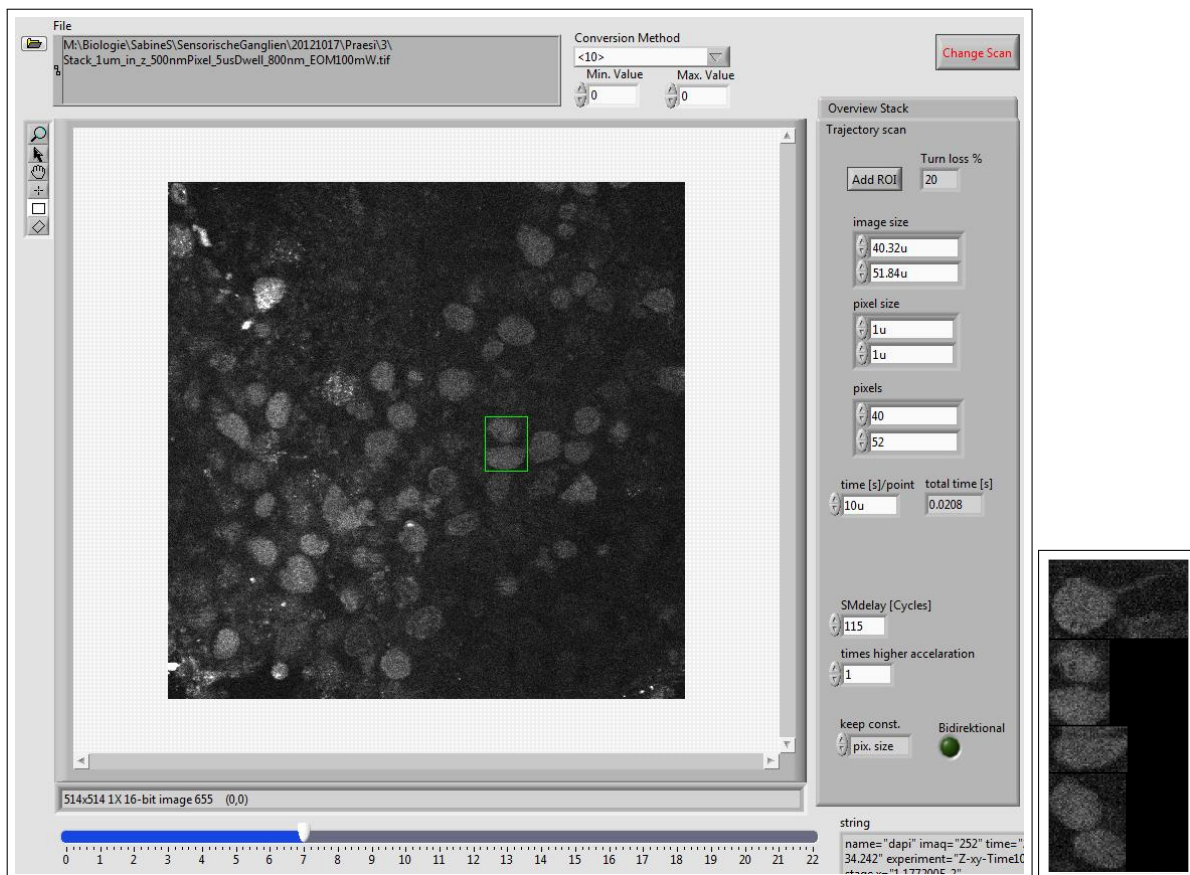


Abb. 4.19.: Trajektorienscan in einem Spinalganglion mit 2D ROIs. Die Benutzeroberfläche der Software erlaubt die Auswahl von kleinen zweidimensionalen ROIs (Region Of Interest) in unterschiedlichen Ebenen, die anschließend nacheinander wiederholt abgescannert werden. Alle Bilder eines Durchgangs werden in eine Datei geschrieben (rechtes Bild), so dass das Ergebnis eines Versuchs aus einem Stapel solcher Bilder besteht. Die vier ROIs waren über eine axiale Distanz von 18 μm verteilt. Die Dauer eines Durchgangs - also das einmalige Abscannen aller 4 ROIs - betrug 0,134 s.

von mehreren Sekunden zerstört. Dies rief, möglicherweise aufgrund des austretenden ATP (Adenosintriphosphat), eine Kalziumionenreaktion der benachbarten Neurone hervor. Direkt im Anschluss an die Zerstörung wurde die Reaktion aufgezeichnet. Der Anstieg des Signals konnte jedoch nicht beobachtet werden, da der Laser nicht gleichzeitig zur Zerstörung des Neurons und zur Anregung von Fluoreszenz an zwei verschiedenen Orten in der Probe verwendet werden kann. Es wurde daher eine Aufnahme der Neurone vor der Zerstörung gemacht, um den Anstieg des Signals nach der Stimulation durch die Zerstörung eines Neurons normieren zu können. Alle Parameter wie Laserintensität, Pixelgröße und Integrationszeit dieser Aufnahme waren identisch mit denen des Trajektorienscans nach der Stimulation.

Der Abfall des Signals nach der Stimulation wurde von Bleichungseffekten überlagert und dadurch verstärkt. Abb. 4.20 zeigt den zeitlichen Verlauf des Signals von fünf Neuronen in direkter Nachbarschaft, also innerhalb von 40 μm , des zerstörten Neurons. Die Helligkeit des Signals I setzt sich aus der räumlichen Mittelung über die Fläche des rechteckigen Scans innerhalb eines Neurons zusammen, das sich über die Zeit ändert. Das Signal des Neurons vor der Stimulation I_0 wurde über die gleiche Fläche gemittelt. Für die Auswertung wurde zunächst der Hintergrund I_H abgezogen, der an einer Stelle ohne Fluoreszenzsignal gemessen wurde. Die Werte der Signalverläufe in Abb. 4.20 ergeben sich durch Normierung auf das Signal vor der Stimulation:

$$\frac{\Delta I(t)}{I_0} = \frac{(I(t) - I_H) - (I_0 - I_H)}{(I_0 - I_H)} \quad (4.4)$$

Ein positiver Wert entspricht daher einer erhöhten Fluoreszenz im Vergleich zu vor der Stimulation. Ein negativer Wert hingegen bedeutet, dass das Signal niedriger ist als vor der Stimulation - hervorgerufen beispielsweise durch Bleichung eines Neurons, das kaum oder gar nicht reagiert hat.

Ein Durchgang dauerte in diesem Fall 0,622 s. Es sind jedoch nicht alle Kurven eingezeichnet, da einige Zellen keine Reaktion zeigten, wie beispielsweise Neuron 5. Der Scan wurde mit der gleichen Laserintensität durchgeführt wie die Zerstörung des Neurons, damit nicht auf die Regelung der Laserleistung gewartet werden muss, bis der Scan beginnen kann. Es wurde eine entsprechend niedrige Integrationszeit von 250 ns gewählt, um die umliegenden Neurone nicht ebenfalls zu zerstören.

Wie bereits erwähnt ist die Zerstörung eines Neurons als Experiment nur ein Mittel zum Zweck. Es liefert per se keine Antwort auf biologisch relevante Fragen, da eine Erhöhung des Signals als Reaktion darauf nicht unerwartet ist, und zusätzlich keine weiteren Erkenntnisse gefolgert werden können. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Methode entwickelt wurde, mit der die zeitliche Entwicklung von Fluoreszenzsignalen distinkter, im Raum verteilter, Regionen detektiert werden kann. Es wurde somit ein Werkzeug geschaffen, das nun nach zahlreichen Testmessungen für Versuche zur Verfügung steht. Bei einem Versuchsent-

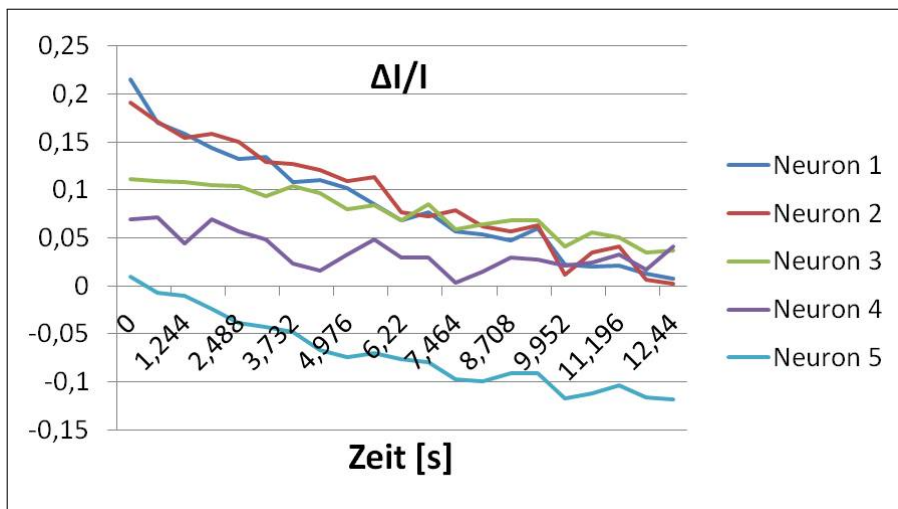


Abb. 4.20: Kalziumsignal in Neuronen eines Spinalganglions.

Der Wert entspricht dem durch Gl. 4.4 beschriebenen hintergrundkorrigierten und normierten Signal. Damit steht ein positiver Wert für eine im Vergleich zu vor der Stimulation erhöhte Fluoreszenz.

wurf ohne Stimulation durch den Messlaser ist auch die Aufzeichnung der gesamten Signalentwicklung möglich, einschließlich des Anstiegs des Signals.

5. Diskussion und Ausblick

5.1. Dreidimensionale Ausrichtung des Versuchstiers für in-vivo Langzeitstudien

Wie in Kap. 3 gezeigt wurde, kann durch das entwickelte Verfahren die kontrastverstärkte Oberfläche des Schädelfensters einer Maus mit einem handelsüblichen Sechssachsentsch (PI Physik Instrumente, Karlsruhe, Deutschland) exakt horizontal ausgerichtet werden. In Seitenansichten je eines durch dieses Fenster aufgenommenen Bilderstapels mit bzw. ohne Ausrichtung war offensichtlich, dass durch die horizontale Lage optimale Voraussetzungen für mikroskopische Zweiphotonen-Aufnahmen entstehen. Dies gilt insbesondere für Langzeitstudien, wo durch wiederholte mikroskopische Aufnahmen über Wochen hinweg Veränderungen an bestimmten Strukturen verlässlich detektiert werden müssen. Da ohne vorherige Ausrichtung zwei Bildstapel, die an unterschiedlichen Tagen aufgenommen wurden, nicht zuverlässig in Deckung zu bringen sind, werden Randbereiche möglicherweise abgeschnitten und stehen folglich nicht für die Datenauswertung zur Verfügung.

Ist das Versuchstier bei jeder Sitzung exakt gleich ausgerichtet, ist zudem gesichert, dass auftretende strukturelle Veränderungen physiologische oder pathologische Gründe haben müssen und nicht durch einen veränderten Blickwinkel entstehen. Automatisierte Bildauswertungsprogramme könnten beim Erkennen von Strukturen versagen, wenn sich ihre relative Lage zueinander ändert. Dem Wissenschaftler stehen daher verlässlichere Daten über die untersuchten mikroskopischen Strukturen und ihre zeitliche Entwicklung zur Verfügung und analytische Interpretationen sind vertrauenswürdiger. Dies gilt auch für Strukturen in der Größenordnung der Punktspreizfunktion, da diese in axialer Richtung eine größere Ausdehnung

hat als in lateraler, und sich Formen durch veränderte Winkel scheinbar verändern können.

Des Weiteren wirkt sich eine horizontale Glasoberfläche positiv auf die Homogenität eines Zweiphotonenbildes aus. Sind beide Seiten einer Aufnahme gleich tief im Gewebe, ist auch die Laserleistung, die dort ankommt, gleich. Zudem werden die Photonen auf ihrem Weg durch das Gehirn in gleichem Maße gestreut.

Der Zeitaufwand für die Ausrichtung der Maus ist mit etwa fünf Minuten durchaus vertretbar und verglichen mit der Zeit, die für den gesamten Versuch nötig ist, gering.

Nachteilig wirkt sich einzig die geringe Präzision des Sechssachsentischs beim Anfahren vorgegebener Orte aus. Eine Automatisierung durch einstellbare Versuchsprotokolle ist hierdurch gescheitert. Er kann daher nur für eine grobe Positionierung genutzt werden, die Feineinstellung erfolgt manuell. Die Genauigkeit, mit der die Winkel eingestellt werden können, ist dafür umso höher. Wie im Ergebnisteil (Kap. 3.3) dargelegt, konnten nach der Ausrichtung des kranialen Fensters Abweichungen von der Horizontalen von unter $\theta = 0,05^\circ$ erreicht werden.

Ähnlich präzise Methoden zur Ausrichtung eines Versuchstiers für in-vivo Langzeitmessungen sind nicht bekannt. In Publikationen zur Präparation der Tiere ist häufig von Titanbalken oder Stangen die Rede, mit der die Maus unter dem Objektiv befestigt wird [Sko05, Hol09]. Eine reproduzierbare, exakt horizontale Ausrichtung ist damit jedoch nicht zu erzielen.

Ausblick

Für zukünftige Projekte ist vorstellbar, die Technik auch in anderen wissenschaftlichen Bereichen einzusetzen. Für Aufnahmen großer Strukturen, wie zum Beispiel Tumoren, die auch in x,y-Richtung aus mehreren hochaufgelösten Bildern zusammengesetzt werden müssen („Stitching“ - engl. Zusammennähen [Pre09]) bietet die vorgestellte Methode den Vorteil, dass alle Teilbilder in der gleichen Ebene liegen. Es kann daher auf eine wiederholte Höhenkorrektur verzichtet werden und ein „Terrasseneffekt“ durch die Zuordnung von Teilbildern in falsche Tiefen bleibt aus.

5.2. Trajektorienscans

In Kap. 4.3 wurden die schnellen Trajektorienscans in akuten Hirnschnitten von Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*) angewandt und die langsamere Variante der durch Sprünge verbundenen zweidimensionalen Scans in Spinalganglien von Hühnerembryonen (*Gallus gallus*) demonstriert. Zuvor wurde in der Programmierumgebung LabVIEW eine Software entwickelt, die es dem Benutzer erlaubt, die Koordinaten der Trajektorie innerhalb der Probe zu bestimmen.

Um den z-Trieb mit den x,y-Scanspiegeln für die gewünschten Scans zu synchronisieren, wurde die Schwingspule hinsichtlich ihrer Zeitverzögerung und Amplitudenabweichung vermessen. Diese wurden softwareseitig ausgeglichen, indem die Amplitude entsprechend vergrößert oder verkleinert wurde und der Befehl verfrüht abgeschickt wurde. Sämtliche Messungen sind in Anhang C aufgeführt. Sowohl für den schnellen Trajektorienscan als auch für das Pendant mit verketteten zweidimensionalen Scans konnten daraufhin in biologischen Beispielsystemen Kalziumreaktionen beobachtet werden.

Hochfrequente Trajektorienscans in den Dendriten der medialen oberen Olive (MSO) von Wüstenrennmäusen

Aufgrund der Trägheit der Schwingspule (Voice Coil) zusammen mit dem schweren Objektiv konnten bei hohen Frequenzen nur sinusförmige Kurven gefahren werden. Dreieckskurven oder andere Formen wurden zu Sinuskurven verschliffen. Daher wurden die x- und y- Koordinaten der Punkte auf der Trajektorie im hierfür entwickelten Programm mit einer Sinuskurve in z-Richtung synchronisiert. Nur so kann der Fahrweg des Laserfokus mit der nötigen Präzision bestimmt werden.

Bei den Amplitudenmessungen der Voice Coil stellte sich heraus, dass sich vor allem Trajektorien mit einer Frequenz von 100 Hz für Messungen von schnellen Kalziumreaktionen in Dendriten eignen. Schnellere Scans führen zu unerwünscht großen Abweichungen der Schwingspule vom Sollwert. Nur bei einem Gesamthub von bis zu 5 μm können Kurven auch noch mit Frequenzen von bis zu 160 Hz gefahren werden (Anhang C.4). Größere Amplituden

führten zu starken Abweichungen der Sinusform und waren nicht vorhersagbar.

Kurven mit deutlich niedrigerer Frequenz im Bereich von 50 Hz wurden – auch bei großen Amplituden – erwartungsgemäß mit sehr großer Genauigkeit ausgeführt. Ziel der Methode war es jedoch, möglichst schnelle Trajektorien zu fahren, um Reaktionen im Neuron mit größtmöglicher zeitlicher Auflösung beobachten zu können. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die örtliche Auflösung bei gleicher Integrationszeit abnimmt. Je schneller der Dendrit abgescannt wird, desto länger ist ein Abschnitt auf dem Dendriten, der im Ergebnisbild einen Pixel ergibt. Wird jedoch zum Ausgleich die Integrationszeit verringert, verschlechtert sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Zur Beobachtung von Kalziumreaktionen in der medialen oberen Olive (MSO) in akuten Hirnschnitten von Wüstenrennmäusen wurden die Trajektorien daher mit 100 Hz gefahren. Dies ergibt bei hoher zeitlicher Auflösung eine sehr hohe Übereinstimmung von Soll- und Istwert der Voice Coil.

Da Hin- und Rückweg auf dem Dendriten identisch sind, beträgt die Frequenz jedoch nur an den beiden Wendepunkten exakt 100 Hz. In der Mitte beträgt sie genau das Doppelte.

Bei 50 Hz und 100 Hz entsprach die Amplitude meist zwar näherungsweise, jedoch nicht exakt dem Wunschwert (siehe Tab. 4.5). Oft waren sie etwas zu klein, manchmal fiel sie zu groß aus. Vor Ausführung des Scans wurde die Amplitude folglich softwareseitig korrigiert. Auch die Zeitverzögerung (siehe Tab. 4.6) der Schwingspule wurde im Bedienprogramm des Trajektorienscans ausgeglichen, indem ihr Befehl jeweils im Vergleich zu den x-,y-Scannern verfrüht abgeschickt wurde.

Nach ihrer Korrektur wurde die geforderte Amplitude mit einer Abweichung von höchstens 0,5 μm erreicht. Bei einer Dicke des Dendriten von 2-6 μm [Rau09] und einer axialen Größe des Laserfokus von etwa 1 μm (Kap. 2.2) ist das optische Signal damit auch bei einer geringen Abweichung vom Sollwert der Trajektorie messbar.

Dies konnte im Experiment an akuten Hirnschnitten der MSO in Wüstenrennmäusen gezeigt werden. Durch Stimulation mit einer Elektrode wurde eine Reaktion im Neuron ausgelöst (siehe Kap. 4.3.2). Das optische Signal des kalziumsensitiven Fluorophors stieg daraufhin im Dendriten deutlich messbar an. Damit konnte demonstriert werden, dass die Methode sich für hochfrequente Messungen in biologischem Gewebe eignet.

Verknüpfte zweidimensionale Scans in Neuronen des Spinalganglions im Haushuhn

In diesem Experiment wurden nicht wie in den Dendriten der MSO linienförmige Trajektorien abgefahren, sondern kleine zweidimensionale Scans durch Sprünge verknüpft. Jeder Scan liegt dabei innerhalb des Somas eines Neurons im herauspräparierten Spinalganglion eines Hühnerembryos (Kap. 4.1.2).

Zweidimensionale Scans vergrößern das Signal-zu-Rausch-Verhältnis im Vergleich zur linienförmigen Trajektorie, wo durch jedes Soma nur eine dünne Linie führen würde. Da hohe Frequenzen in diesem Fall zweitrangig waren, wurde für diesen Versuch ein eigener, langsamerer Scanmodus entwickelt.

Auch hier wurden die Differenzen zwischen Soll- und Istwert der Voice Coil für verschiedene Amplituden und Frequenzen gemessen und analysiert. Die im Experiment möglichen Frequenzen sind jedoch deutlich geringer als bei den Trajektorienscans, da immer wieder für einen zweidimensionalen Scan angehalten werden muss. Die verwendeten Frequenzen lagen daher stets nur im Bereich von etwa 1 Hz. Der Vollständigkeit halber, und um die Daten für zukünftige Experimente zur Verfügung zu stellen, wurden die Sprungmessungen der Voice Coil jedoch auch bei hohen Frequenzen durchgeführt (Anhang C.5). Auch hier lässt die Übereinstimmung der Soll- und Istwerte bei hohen Frequenzen und großen Amplituden nach und ist bei den Sprüngen sogar schlechter als bei Sinuskurven. Trotzdem konnte das Experiment im Spinalganglion erfolgreich durchgeführt werden. Die Abweichungen von bis zu 2 μm bei 100 Hz sind im Vergleich zum Durchmesser eines Somas von etwa 10 μm gering. Der Laserfokus liegt also immer innerhalb des Zellkörpers. Zudem wurde bei der Ausführung des Sprungtrajektorienscans nach jedem Sprung 3 ms gewartet, bevor der zweidimensionale Scan ausgeführt wurde. Die Aufnahme des optischen Signals in der Zelle beginnt folglich erst nach dem Einschwingvorgang der Voice Coil.

Durch Zerstörung eines Neurons im Ganglion durch den Laser mit hoher Leistung wurde das darin enthaltene Adenosintriphosphat (ATP) freigesetzt. Durch die entwickelte Technik war es möglich, daraufhin das erhöhte optische Signal in den benachbarten Zellen zu

detektieren (Kap. 4.3.2). Da der Laser in diesem Fall sowohl für die Stimulation als auch für die Detektion des Signals verwendet wurde, konnte der Signalanstieg nicht mit gemessen werden. Erst nach der Umstellung einiger Parameter von „Zerstörung“ auf „Messung“ konnte das Signal aufgezeichnet werden, was eine zeitliche Verzögerung mit sich brachte. Durch Vergleich mit Werten vor der Zerstörung konnte die Erhöhung des optischen Signals und damit die Reaktion der umliegenden Neurone jedoch nachgewiesen werden.

Obwohl dieses Experiment aufgrund der Stimulation durch Zerstörung eines Neurons – und damit eines Teils des zu untersuchenden biologischen Systems – an sich keine biologischen Ergebnisse liefert, zeigt es doch, dass die Methode funktioniert. Sie steht damit für weitere Versuche zur Verfügung.

Vergleich der Trajektorienscans mit bekannten Methoden

Wie einleitend in Kap. 4 erwähnt, sind bereits ähnliche Techniken bekannt. Etabliert sind beispielsweise Linienscans, die eine Region der Probe sehr schnell, jedoch nur in einer Dimension, abscannen können (z.B. in [Sto03]). Benutzerbestimmte, zweidimensionale Scans werden in [Lil08] vorgestellt. Beides wird jedoch den meisten biologischen Strukturen nicht gerecht, da diese sich in allen drei räumlichen Dimensionen ausdehnen.

In [Gö7] wird eine Technik vorgestellt, die ein bestimmtes Volumen mit verschiedenen dreidimensionalen Mustern wiederholt abscannt. Es handelt sich dabei jeweils um geschlossene Trajektorien, die spiralförmig, rechteckförmig, im Lissajous-Muster oder benutzerdefiniert möglichst große Teile des Raums abdecken. Es wird untersucht, mit welchem Muster am meisten der darin enthaltenen Somata durch die Trajektorie getroffen werden. Diese Methode unterscheidet sich jedoch deutlich von der in dieser Arbeit entwickelten, da hier nicht nur „möglichst viel“ der zu untersuchenden Struktur getroffen werden soll, sondern alles. Aufgrund der unterschiedlichen Anforderungen eignet sich diese Methode daher nicht zur Untersuchung von Kalziumreaktionen in Dendriten.

Dreidimensionale, benutzerdefinierte Trajektorien zur Visualisierung von Reaktionen in Dendriten wurden hingegen in [Kat11] präsentiert. Diese unterscheiden sich nur durch die Art

des z-Triebs von der im Rahmen dieser Arbeit präsentierten. Im Gegensatz zur hier verwendeten magnetischen Schwingspule, wurde mit einem Piezoaktuator gearbeitet. Kommerziell verfügbare Piezos haben jedoch nur einen Hub von bis zu 400 μm . Die Voice Coil bietet bei gleicher Präzision einen Hub von mehreren Millimetern und kann so in vielen Anwendungen einen in axialer Richtung verfahrbaren Mikroskoptisch ersetzen. Da die Eigenschaften einer solchen Schwingspule bezüglich mikroskopischer Anwendungen und Trajektorienscans bis dato nicht untersucht oder veröffentlicht wurden, stellen die Messungen im Rahmen dieser Arbeit wichtige Anhaltspunkte dar.

Eine Methode, die der durch Sprünge verketteten zweidimensionalen Scans gleicht, ist bisher nicht bekannt.

Ausblick

Bei beiden im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Modi des Trajektorienscans sind konkrete zukünftige Projekte denkbar, die interessante biologische Fragestellungen angehen.

Im Fall der Zweiphotonenmikroskopie mit hochfrequenten Trajektorienscans an Dendriten von Neuronen der medialen oberen Olive (MSO) könnten Daten generiert werden, die bisher durch andere Methoden nicht zugänglich waren. Insbesondere ist die Anzahl der Eingänge auf ein spezifisches MSO-Neuron von nur einer anderen bestimmten Zelle von großem Interesse [Cou10, Kem98, Coo03]. Es konnte gezeigt werden, dass Teile von Dendriten bis zu einer Länge von 200 μm wiederholt mit großer örtlicher und zeitlicher Auflösung abgescannt werden können; typische Scanfrequenzen betrugen 50 Hz bis 200 Hz. Die Orte und die Dichte einzelner Eingänge eines Neurons auf ein anderes können bestimmt werden, indem das erste elektrophysiologisch stimuliert wird, und das resultierende Kalziumsignal via Trajektorienscans entlang des zweiten detektiert wird.

Ähnliche Techniken wurden in anderem Zusammenhang bereits eingesetzt [Kat11], jedoch mit hoch-affinen Kalziumfarbstoffen. Folglich können die Eingänge anderer Neurone auf dem Dendriten örtlich nicht aufgelöst werden, da das Signal über die Länge des gesamten Dendriten schwimmt. Da im Fall der Dendriten von MSO Neuronen keine Dornfortsätze vorhan-

den sind, die auf einen Eingang hinweisen [Rau09], besteht in der Zweiphotonenmikroskopie keine andere Möglichkeit, diese zu lokalisieren. Ein Projekt, das einen niedrig-affinen Kalziumfarbstoff einsetzt, könnte die Anzahl und Orte der Eingänge eines einzelnen Neurons auf ein anderes in eleganter Weise bestimmen.

Da die Stimulation im Fall der Neuronen im Ganglion des Haushuhns im Rahmen der technischen Entwicklung durch die Zerstörung einer Nervenzelle durch einen Laser geschah, wäre es denkbar, die Zelle in einem nächsten Schritt durch ein chemisches oder elektrisches Signal zu erregen. Einerseits käme hierfür die Freigabe einer hohen Konzentration von Neurotransmittern durch Lichteinwirkung in unmittelbarer Nähe der Nervenzelle in Frage („*Uncaging*“ [Pet97]), andererseits die Erregung über eine Mikroelektrode. Interessant wäre in diesem Zusammenhang, ob und wie die Erregung innerhalb der umliegenden Nervenzellen des Ganglions weitergeleitet würde.

A. Einzelmessungen zur Bestimmung der Punktspreizfunktion für den Aufbau für die Trajektorienscans (Kap. 4)

x	y	z
501,1	431,8	1183,1
538,5	488,2	1091,0
555,3	380,4	1221,2
458,5	458,2	1054,2
364,0	482,0	1208,9
431,0	430,6	1102,4
518,9	500,1	1137,3
539,6	567,0	1132,7
575,7	535,3	1228,5
458,0	547,1	1054,4
387,7	410,7	1084,1
484,6	541,2	1025,5
515,1	559,0	1227,1
390,2	566,1	1060,6
439,6	521,6	1149,2
456,6	568,7	977,7
420,1	598,1	1000,7
Mittelwert [μm]:	488,8	1114,0

Tabelle A.1.: Die Tabelle listet die Werte von Profilen von 17 170 μm großen fluoreszierenden Kügelchen aus Abb. 2.4 in x, y und z. Die Profile wurden an eine Normalverteilung gefittet. Die Werte beziehen sich auf die Halbwertsbreite der Fits. Der laterale Mittelwert fasst die Werte in x- und y-Richtung zusammen.

B. Weitfeldbilder der markierten Glasoberfläche zur dreidimensionalen Ausrichtung der Probe (zu Kap. 3.2)

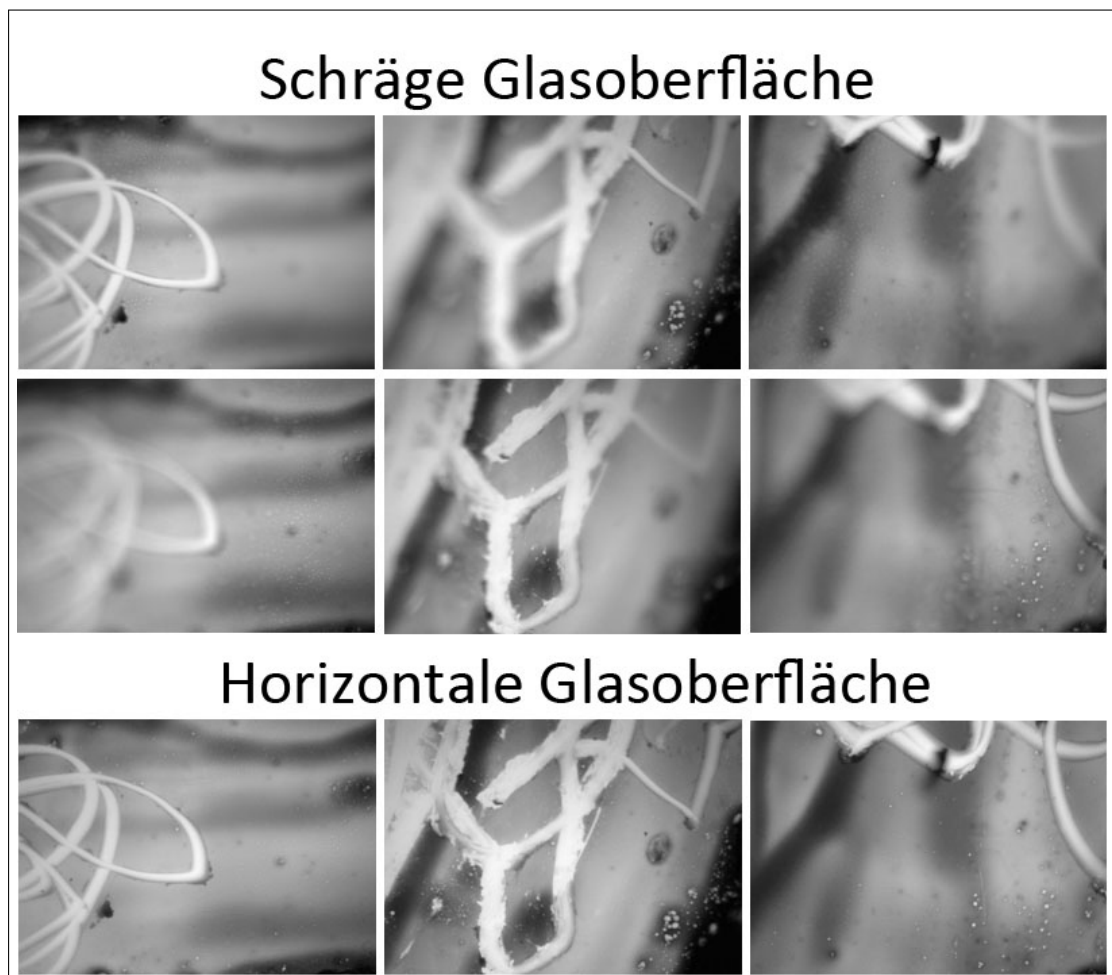


Abb. B.1.: Ausrichtung der Oberfläche des kranialen Fensters. Aufgrund der Schräge des Glases ist im nicht ausgerichteten Fall immer nur ein Teil des Bildes scharf.

C. Räumliche und zeitliche Abweichungen der Position der Voice Coil vom Sollwert

C.1. Abweichungen der Position der Voice Coil vom Sollwert bei Sinusbewegungen

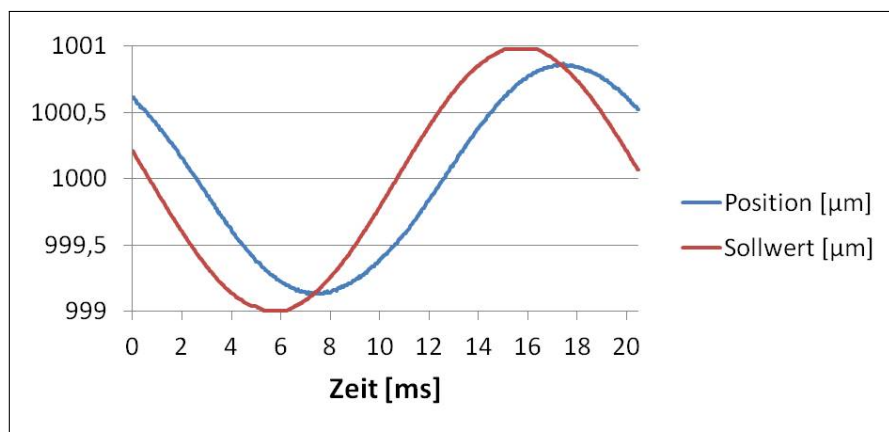


Abb. C.1.: 1 μm Amplitude, 50 Hz

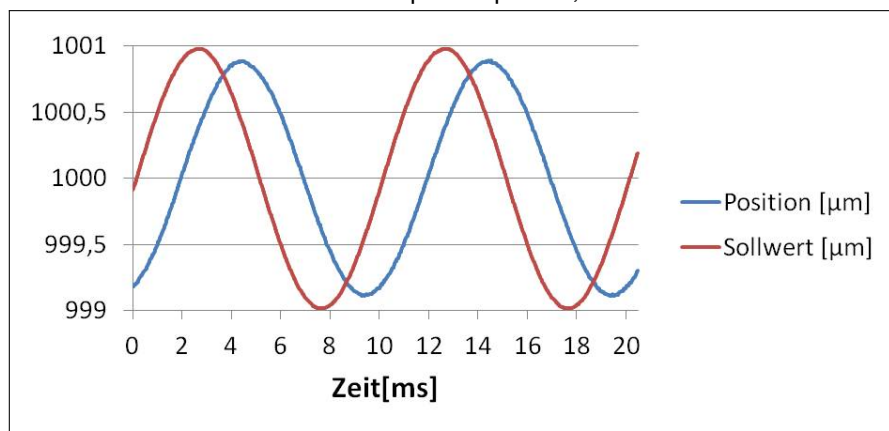


Abb. C.2.: 1 μm Amplitude, 100 Hz

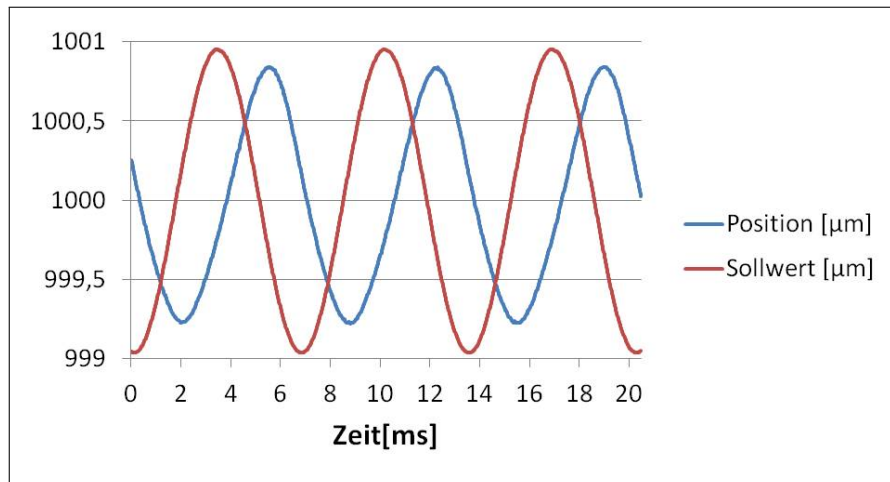


Abb. C.3.: 1 μm Amplitude, 150 Hz

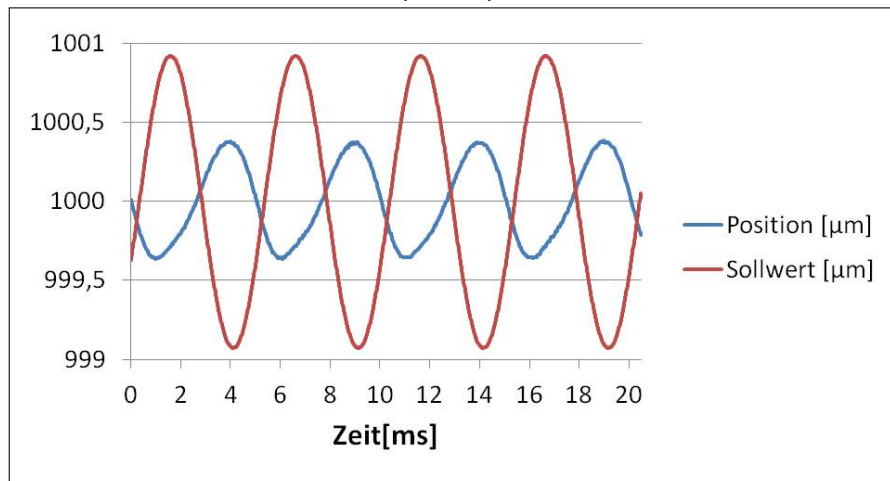


Abb. C.4.: 1 μm Amplitude, 200 Hz

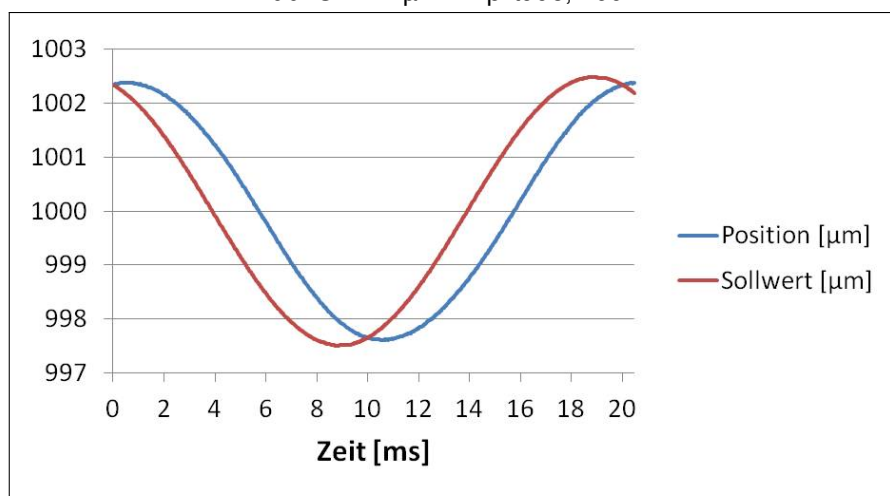


Abb. C.5.: 2,5 μm Amplitude, 50 Hz

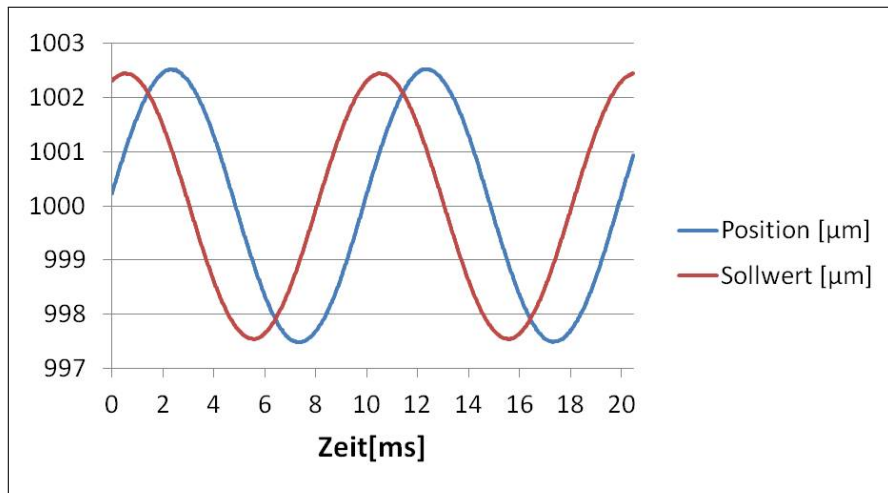


Abb. C.6.: 2,5 μm Amplitude, 100 Hz

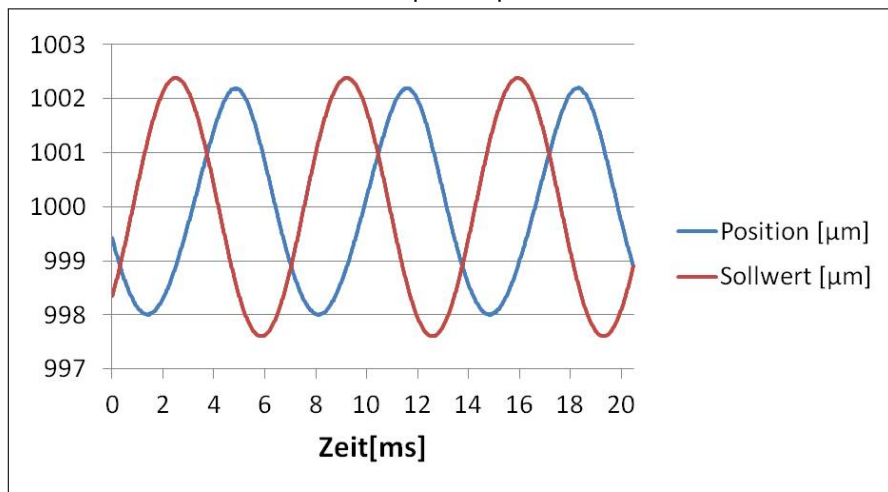


Abb. C.7.: 2,5 μm Amplitude, 150 Hz

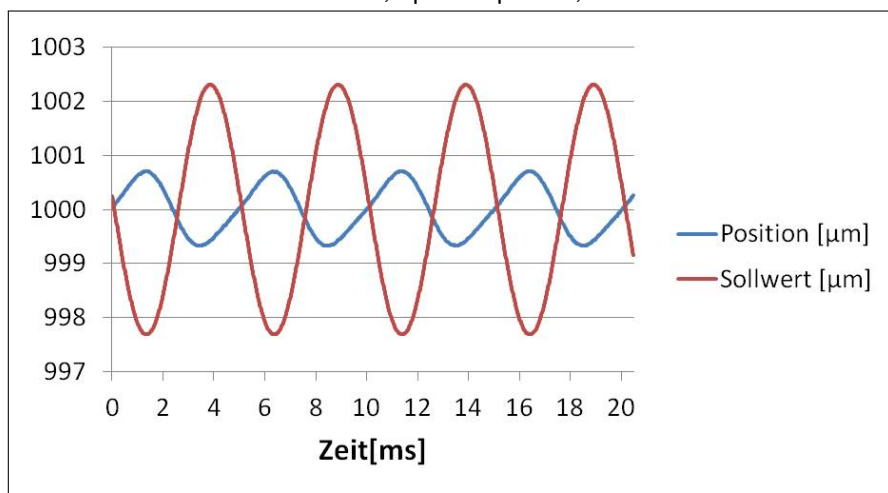


Abb. C.8.: 2,5 μm Amplitude, 200 Hz

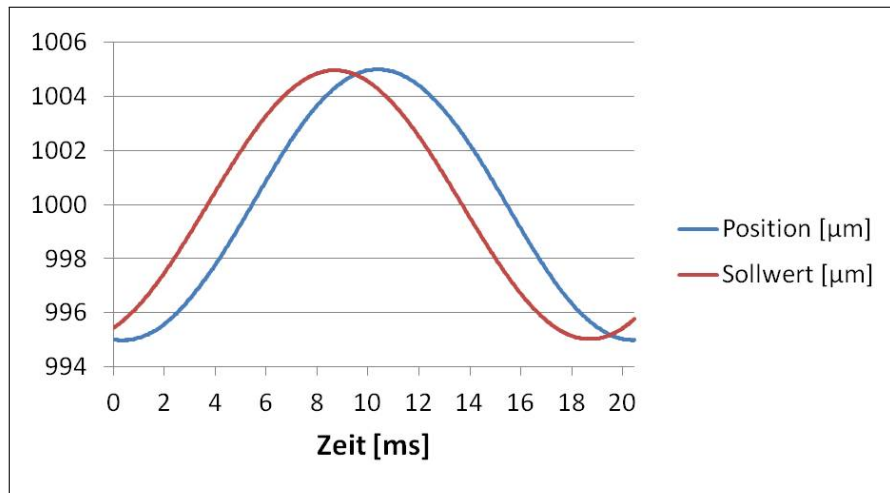


Abb. C.9.: 5 μm Amplitude, 50 Hz

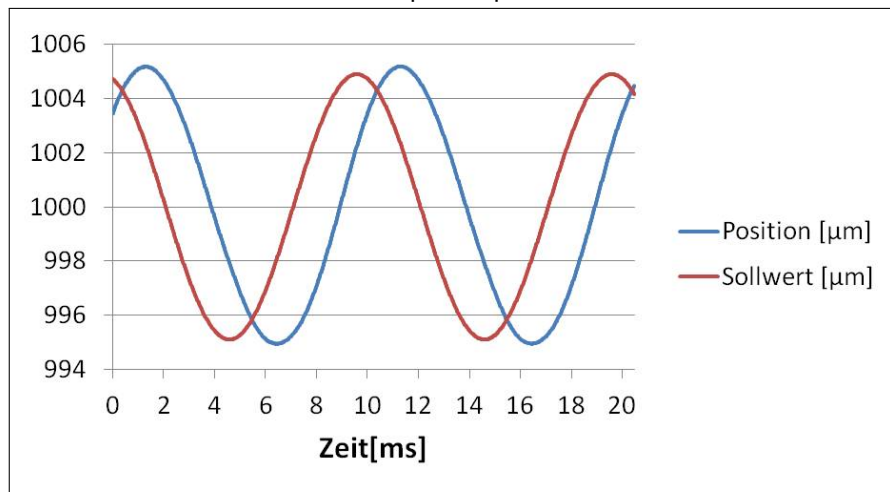


Abb. C.10.: 5 μm Amplitude, 100 Hz

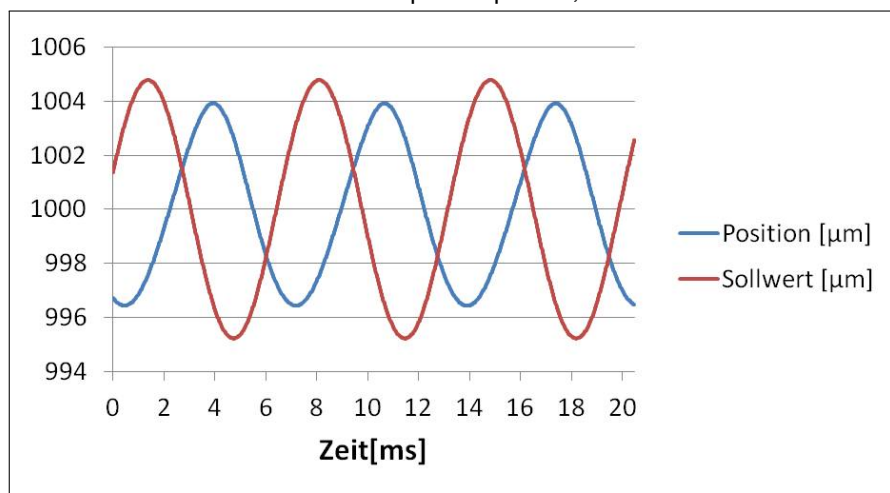


Abb. C.11.: 5 μm Amplitude, 150 Hz

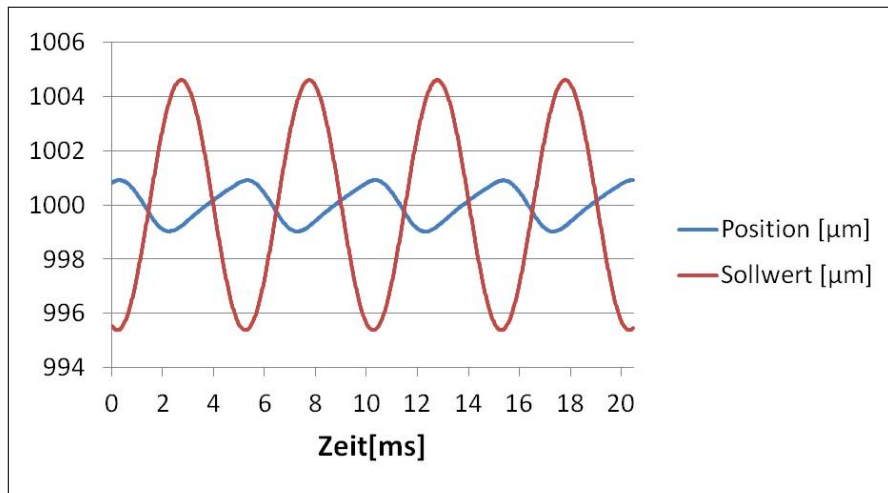


Abb. C.12.: 5 μm Amplitude, 200 Hz

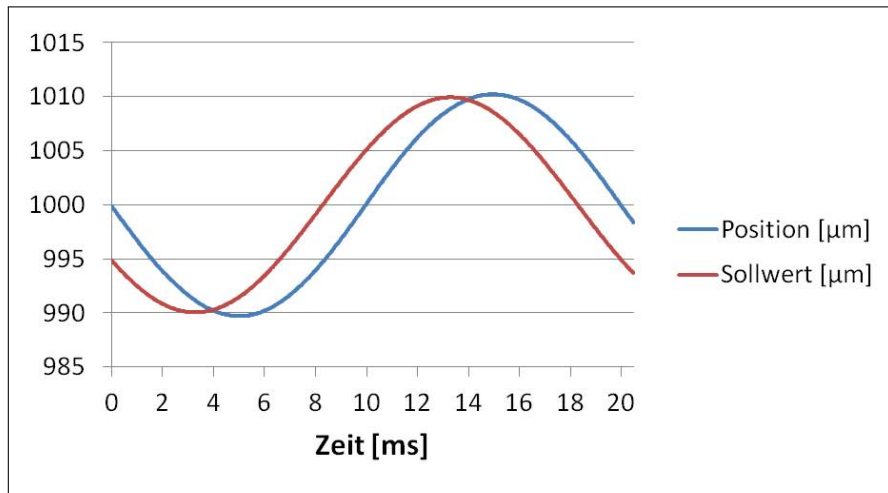


Abb. C.13.: 10 μm Amplitude, 50 Hz

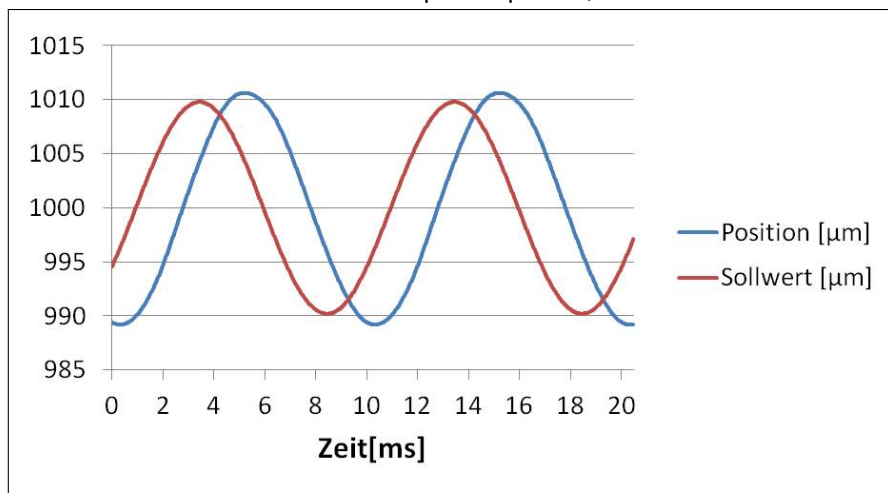


Abb. C.14.: 10 μm Amplitude, 100 Hz

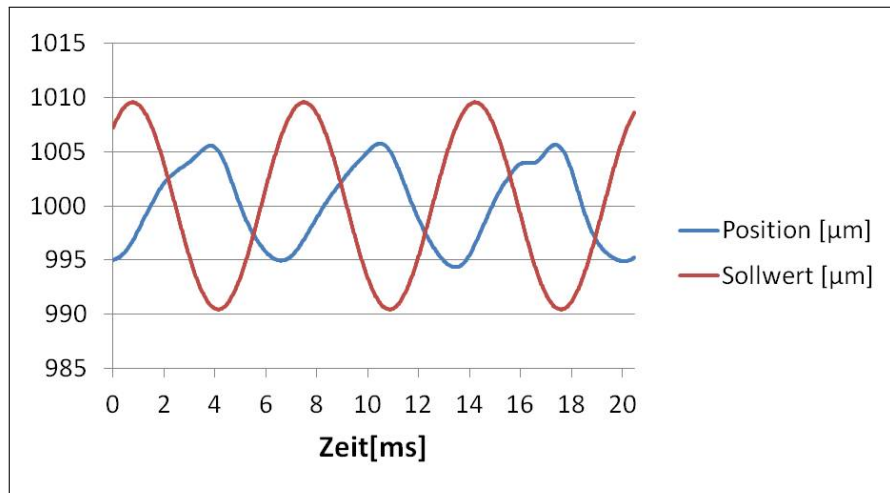


Abb. C.15.: 10 μm Amplitude, 150 Hz

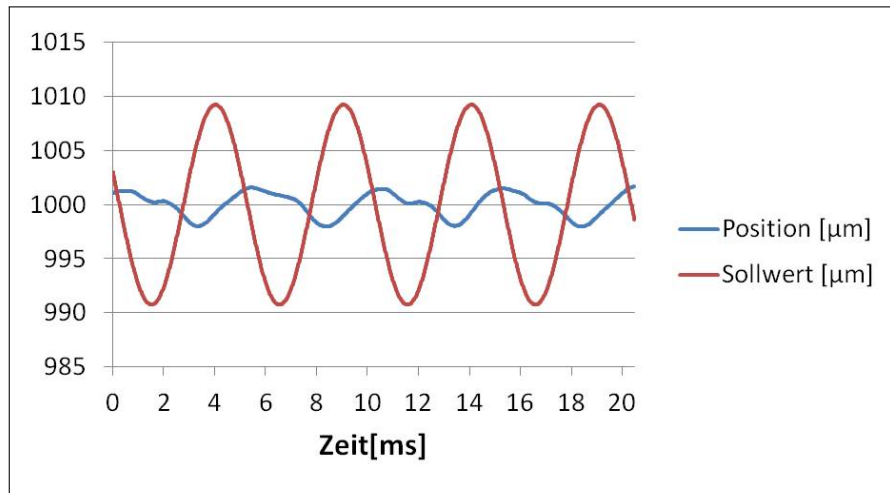


Abb. C.16.: 10 μm Amplitude, 200 Hz

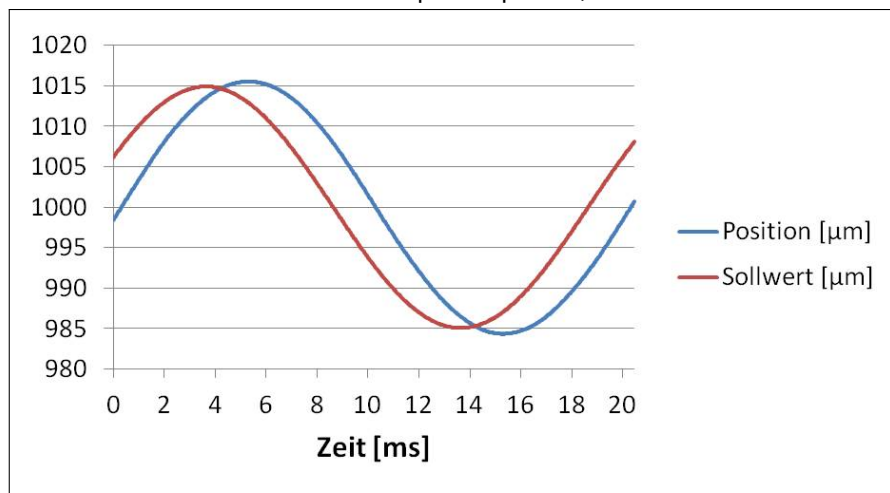


Abb. C.17.: 15 μm Amplitude, 50 Hz

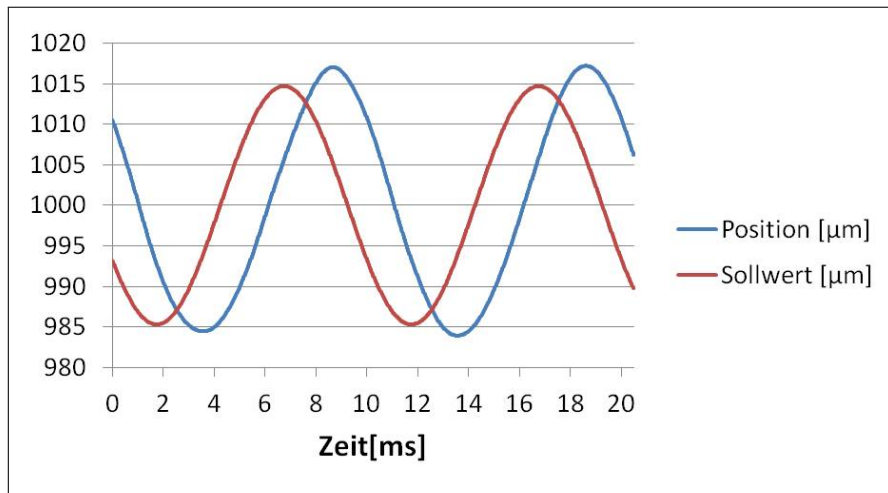


Abb. C.18.: 15 μm Amplitude, 100 Hz

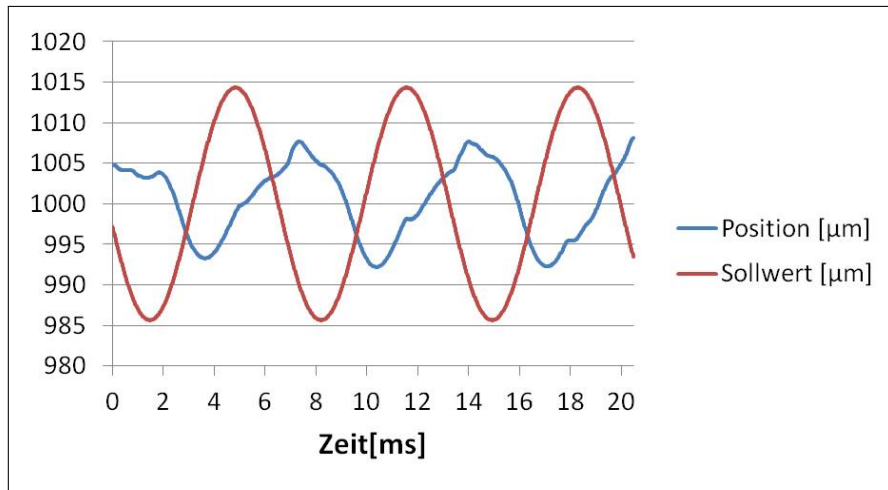


Abb. C.19.: 15 μm Amplitude, 150 Hz

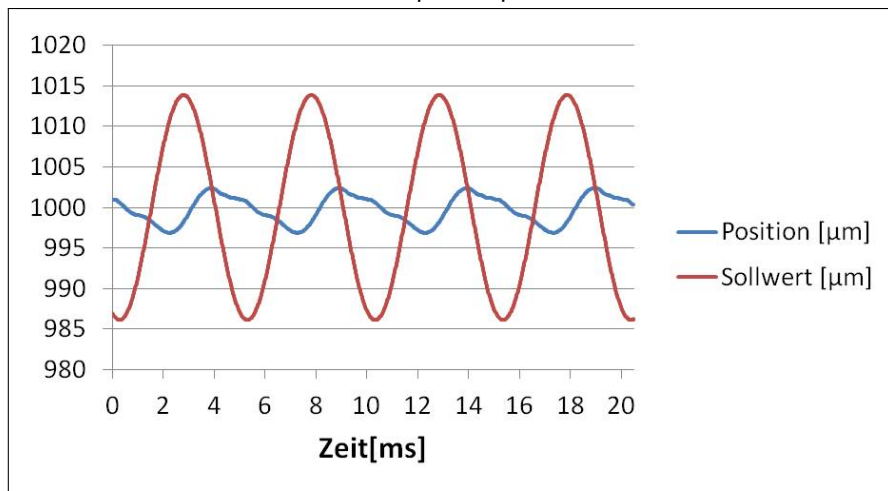


Abb. C.20.: 15 μm Amplitude, 200 Hz

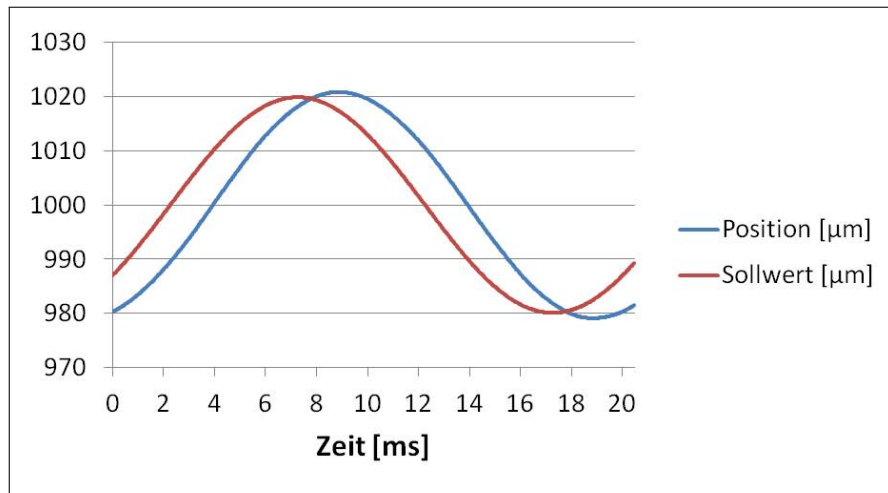


Abb. C.21.: 20 μm Amplitude, 50 Hz

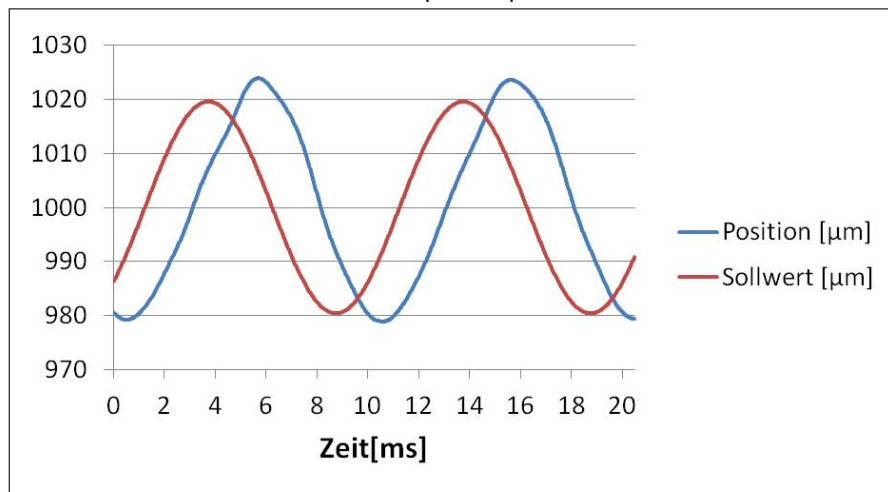


Abb. C.22.: 20 μm Amplitude, 100 Hz

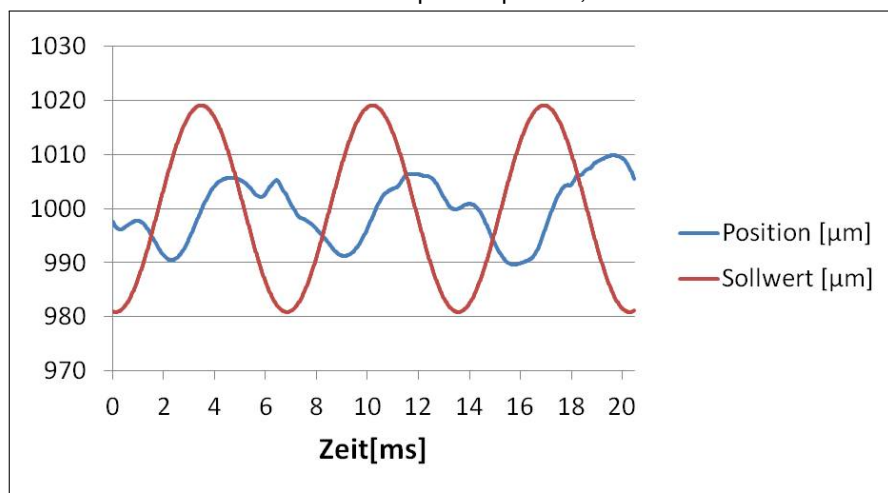


Abb. C.23.: 20 μm Amplitude, 150 Hz

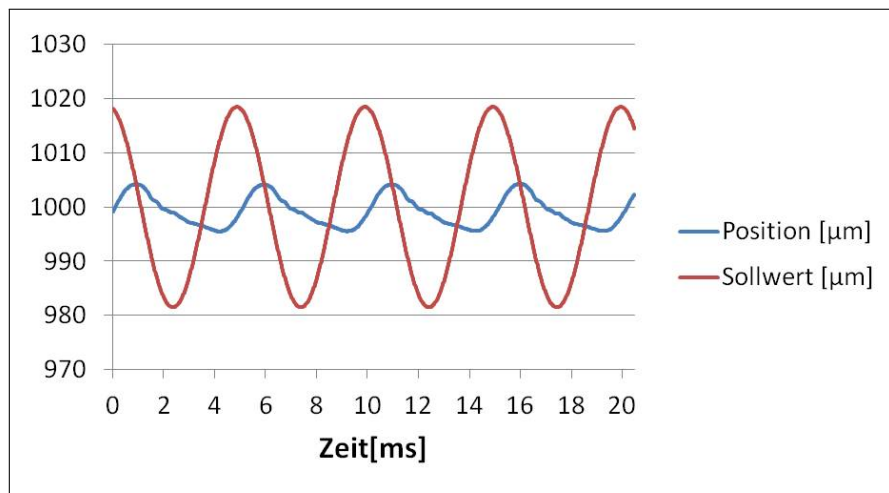


Abb. C.24.: 20 μm Amplitude, 200 Hz

C.2. Abweichungen der Position der Voice Coil vom Sollwert bei Dreieckbewegungen

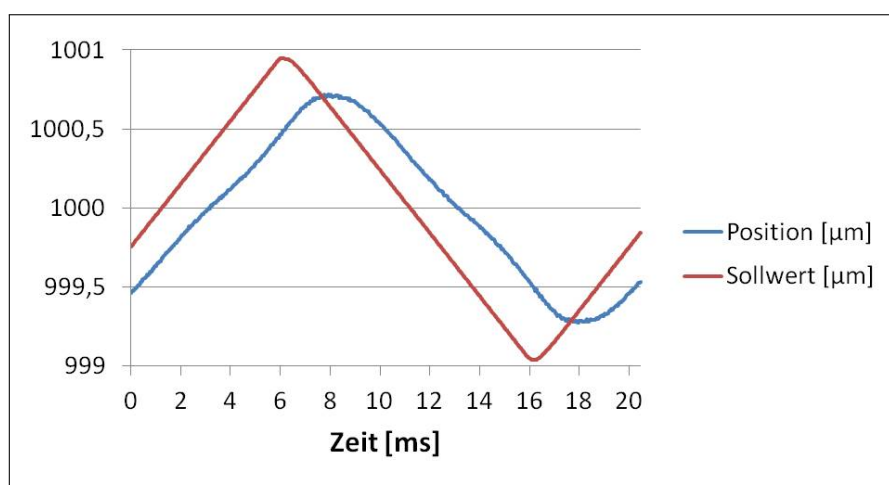


Abb. C.25.: 1 μm Amplitude, 50 Hz

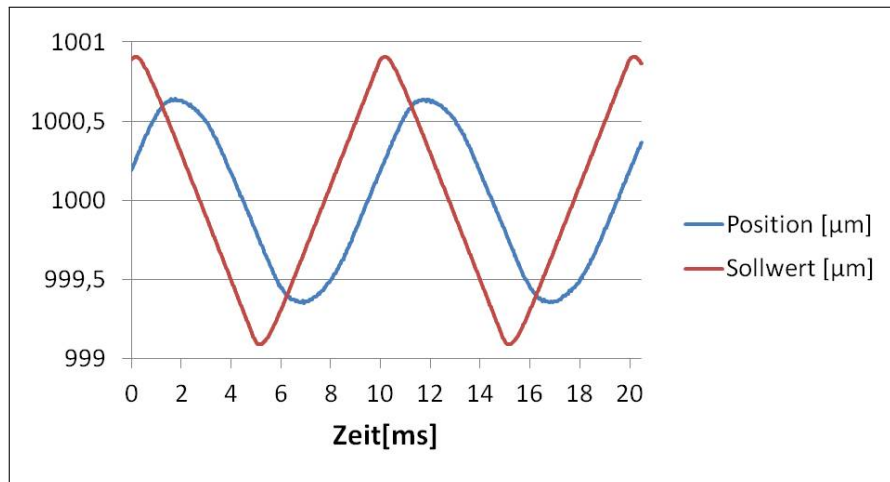


Abb. C.26.: 1 μm Amplitude, 100 Hz

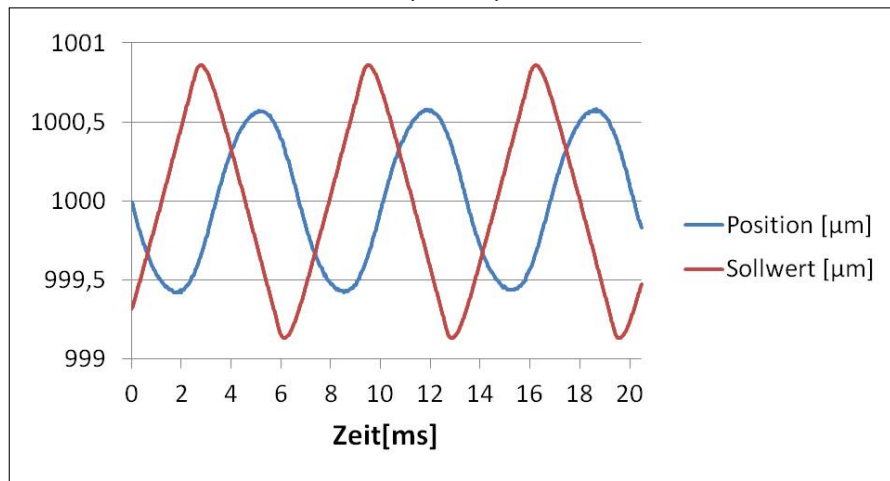


Abb. C.27.: 1 μm Amplitude, 150 Hz

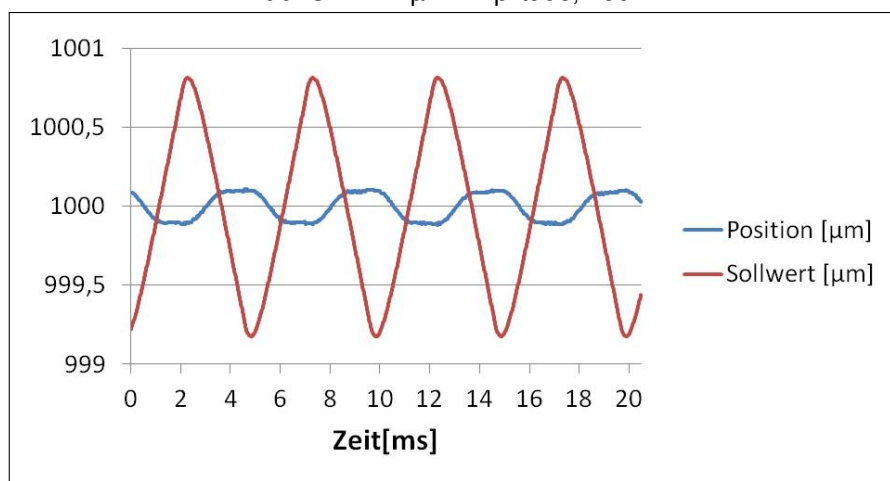


Abb. C.28.: 1 μm Amplitude, 200 Hz

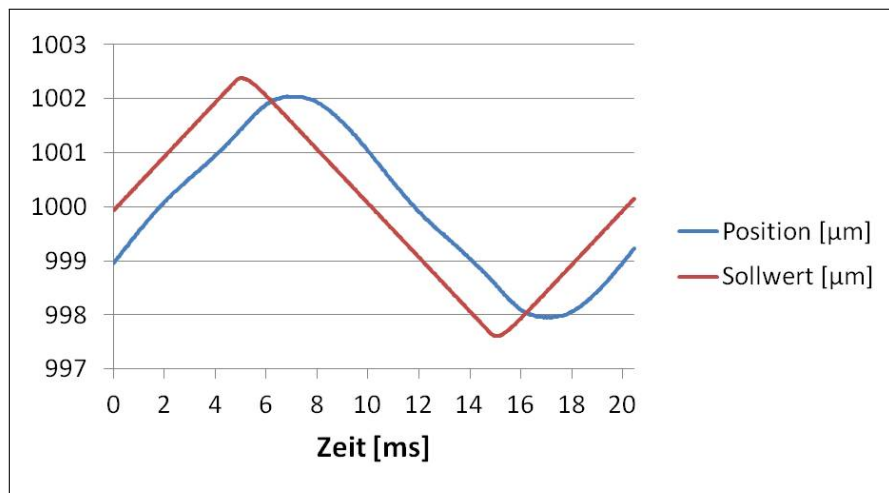


Abb. C.29.: 2,5 μm Amplitude, 50 Hz

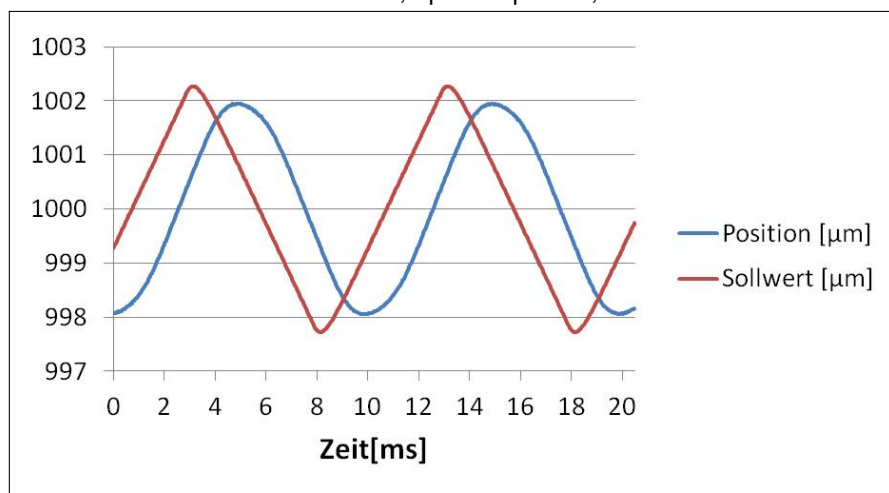


Abb. C.30.: 2,5 μm Amplitude, 100 Hz

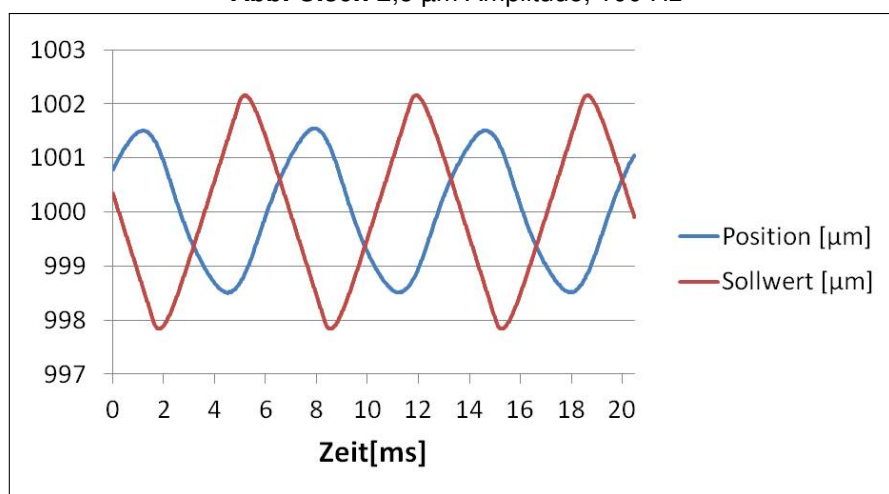


Abb. C.31.: 2,5 μm Amplitude, 150 Hz

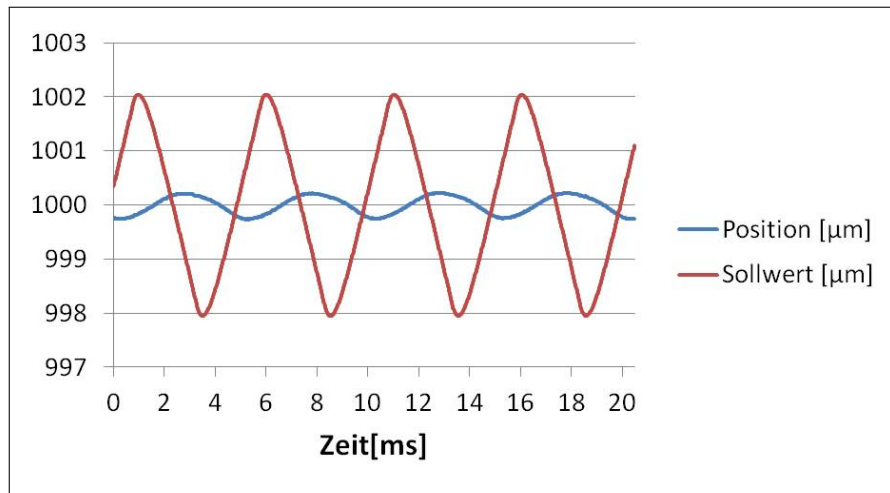


Abb. C.32.: 2,5 µm Amplitude, 200 Hz

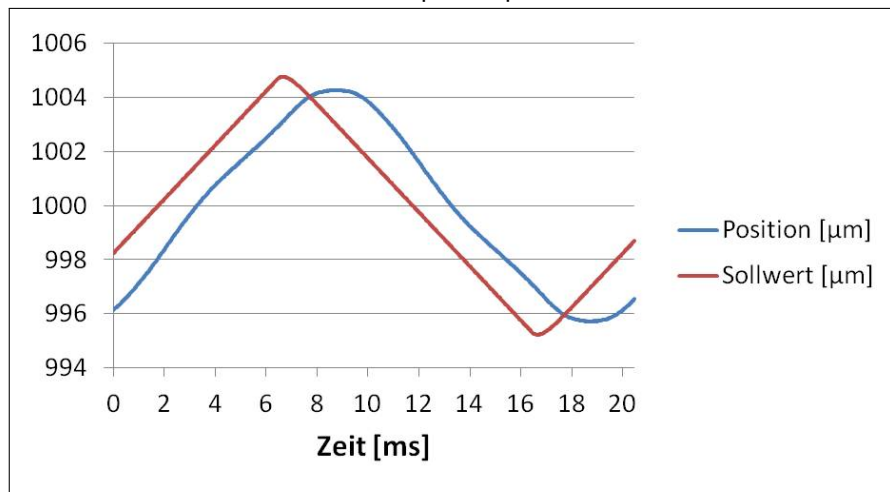


Abb. C.33.: 5 µm Amplitude, 50 Hz

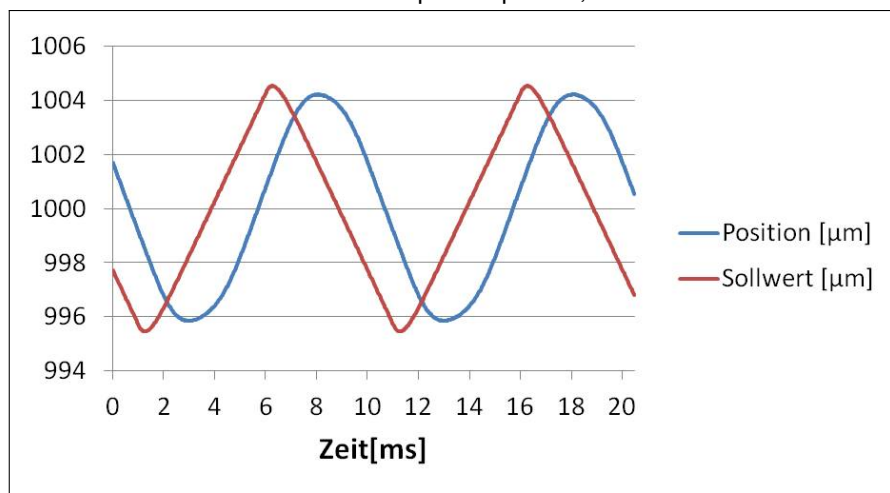


Abb. C.34.: 5 µm Amplitude, 100 Hz

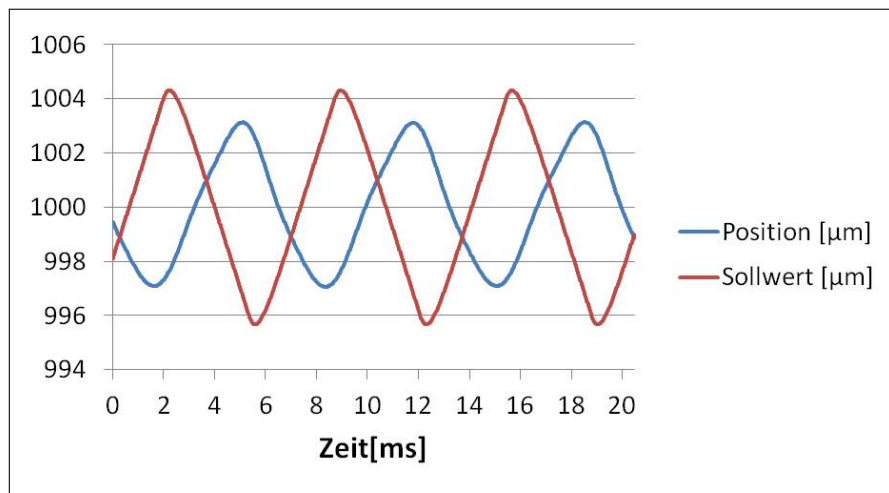


Abb. C.35.: 5 μm Amplitude, 150 Hz

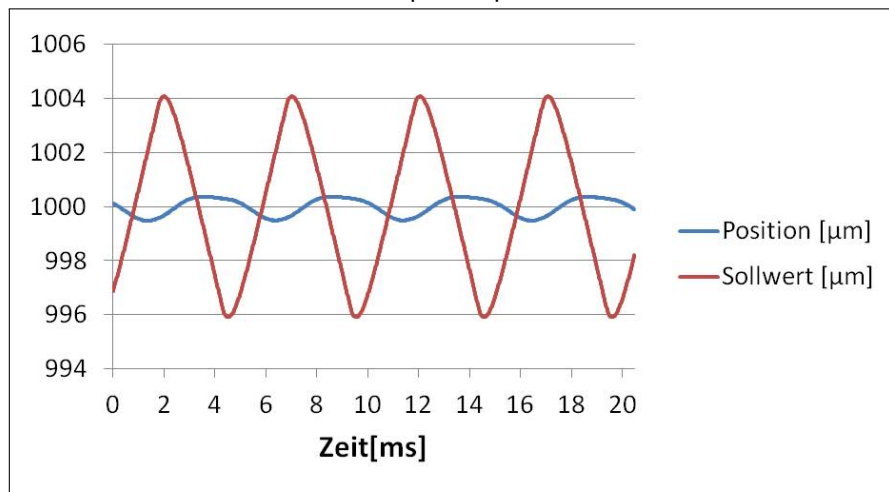


Abb. C.36.: 5 μm Amplitude, 200 Hz

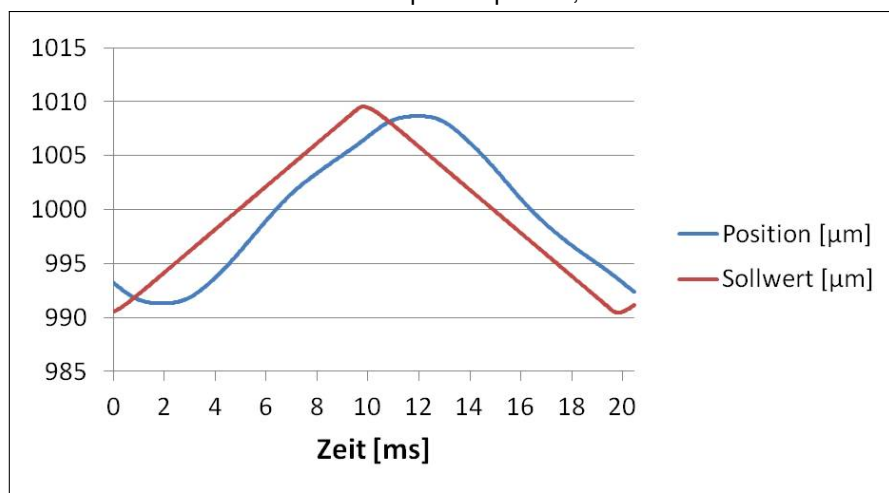


Abb. C.37.: 10 μm Amplitude, 50 Hz

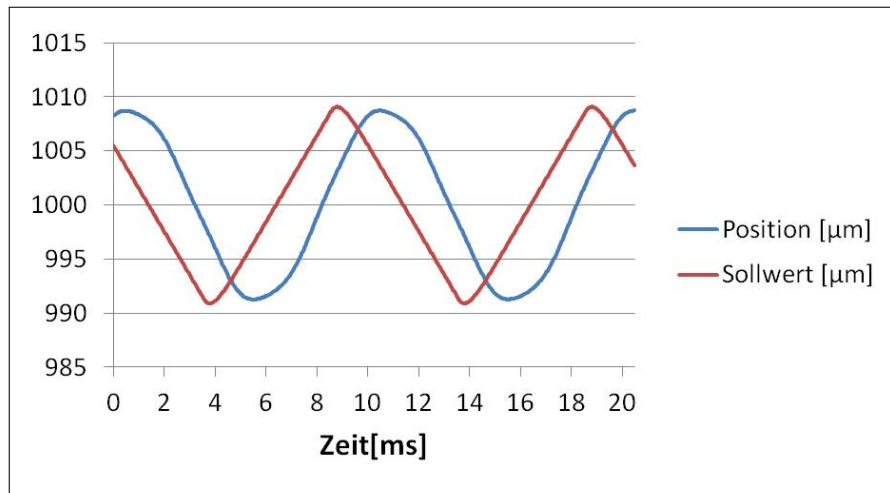


Abb. C.38.: 10 μm Amplitude, 100 Hz

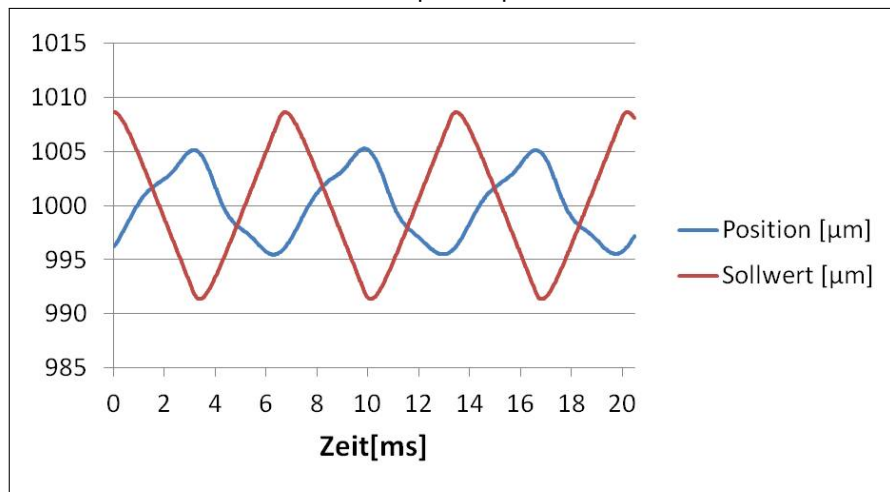


Abb. C.39.: 10 μm Amplitude, 150 Hz

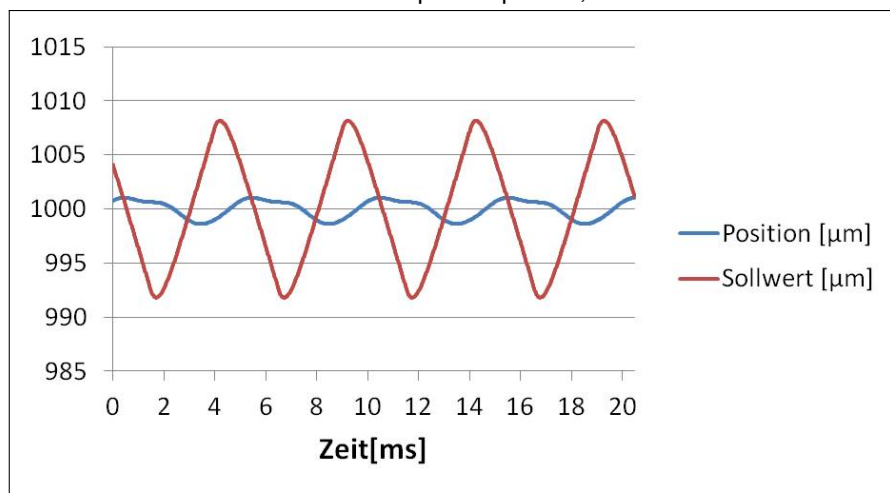


Abb. C.40.: 10 μm Amplitude, 200 Hz

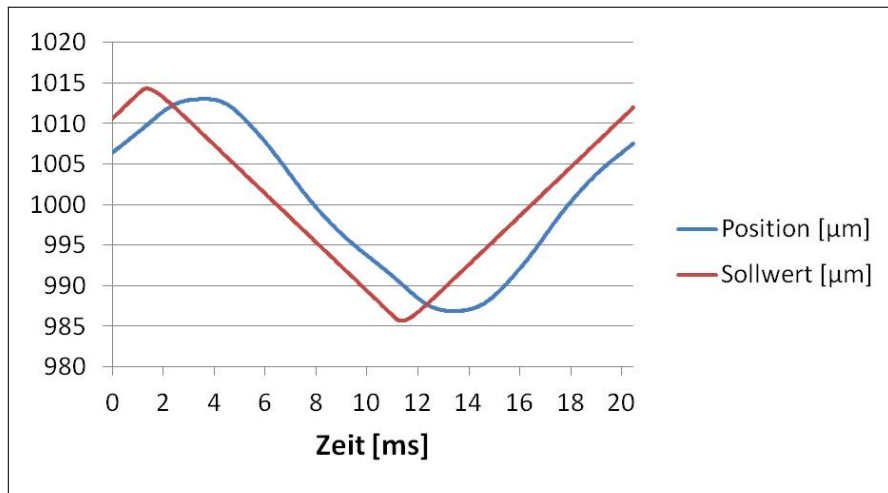


Abb. C.41.: 15 μm Amplitude, 50 Hz

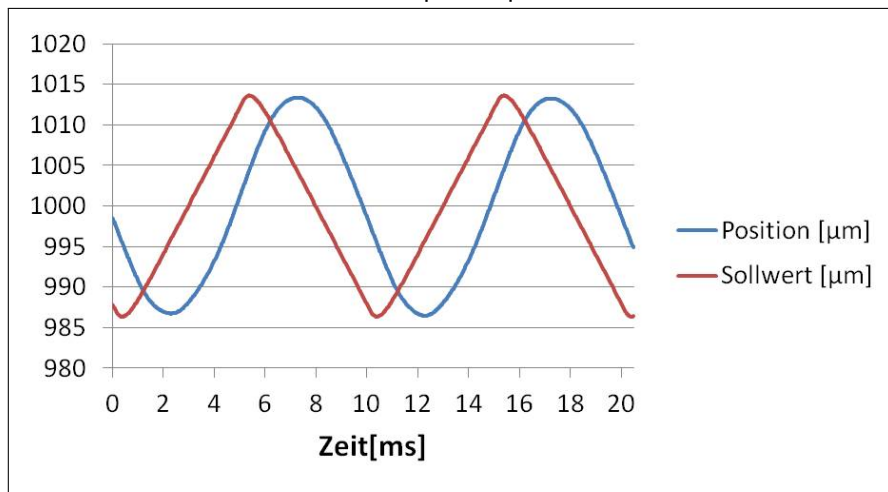


Abb. C.42.: 15 μm Amplitude, 100 Hz

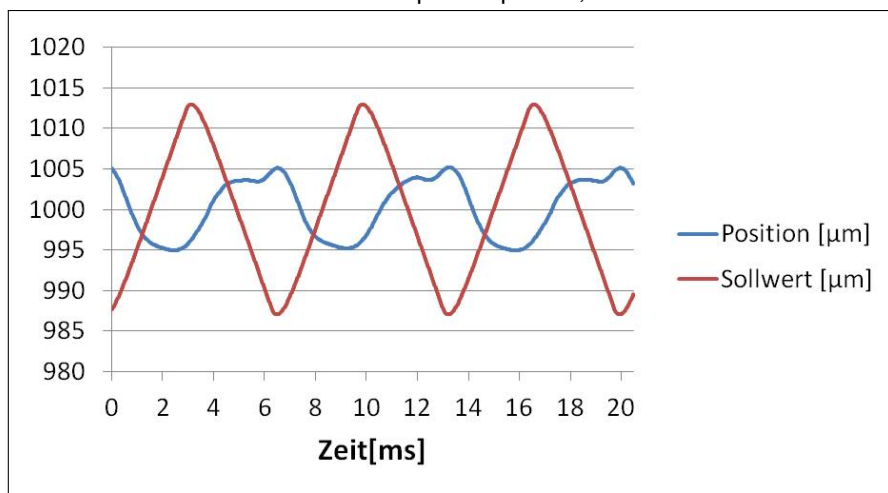


Abb. C.43.: 15 μm Amplitude, 150 Hz

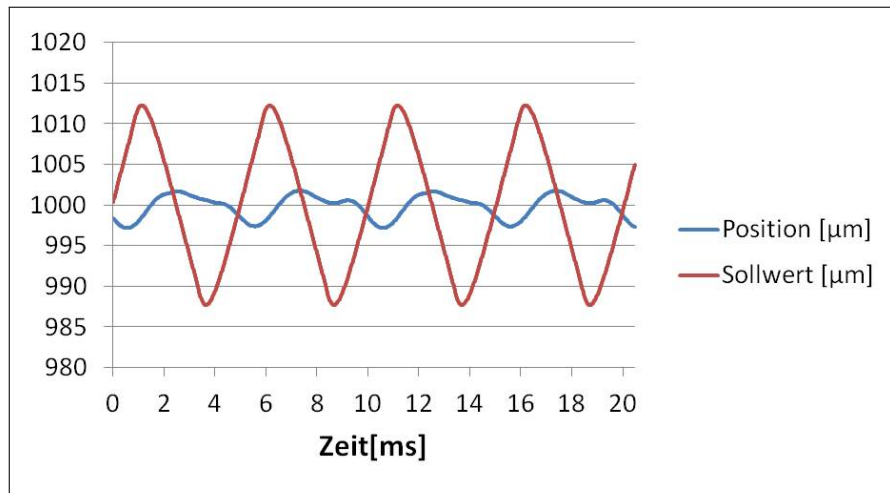


Abb. C.44.: 15 μm Amplitude, 200 Hz

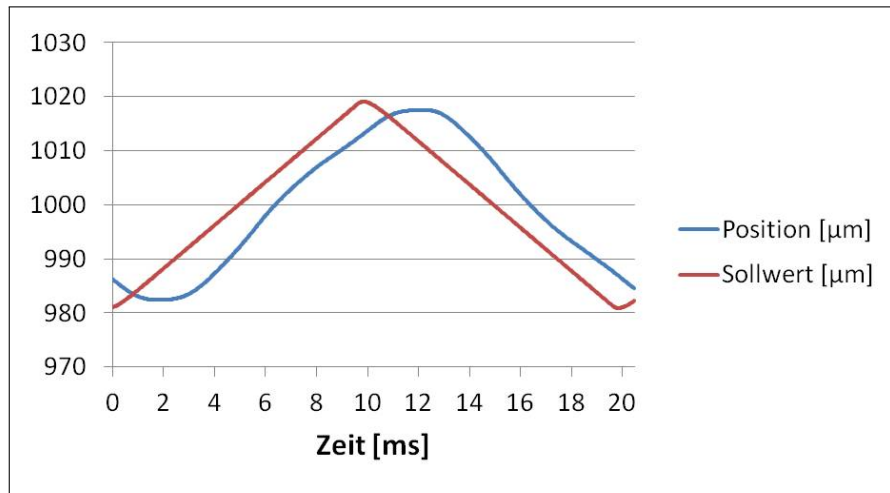


Abb. C.45.: 20 μm Amplitude, 50 Hz

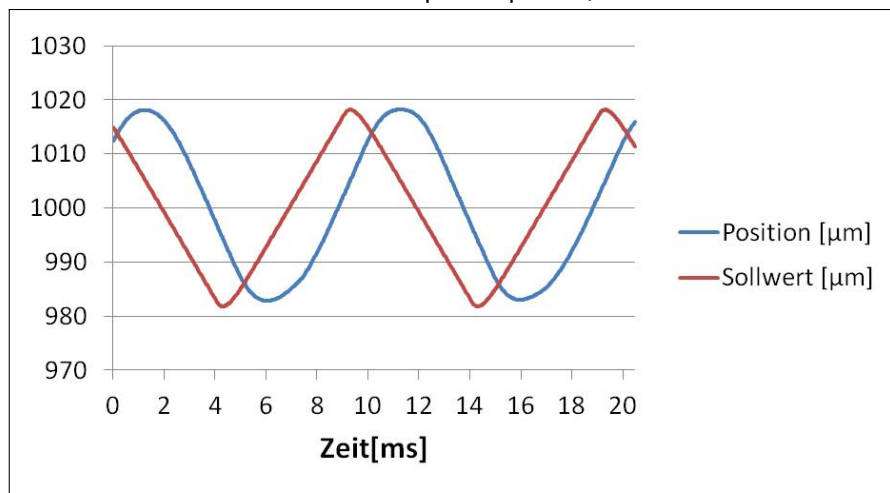


Abb. C.46.: 20 μm Amplitude, 100 Hz

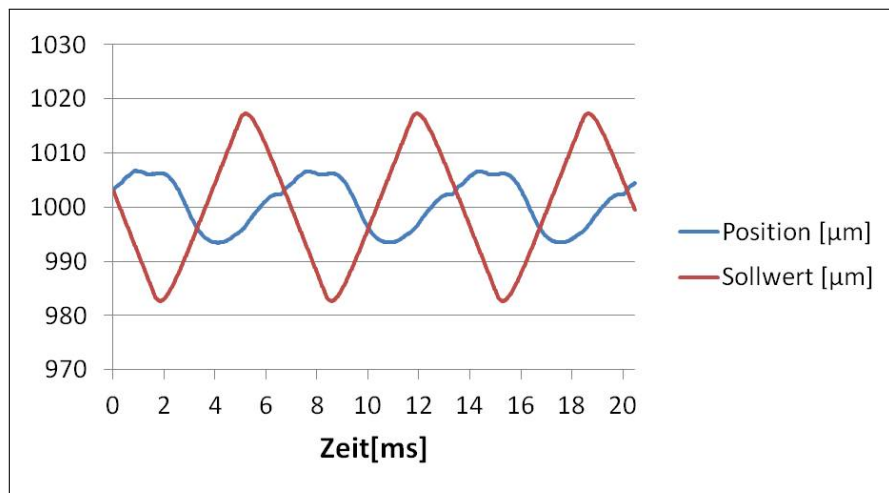


Abb. C.47.: 20 μm Amplitude, 150 Hz

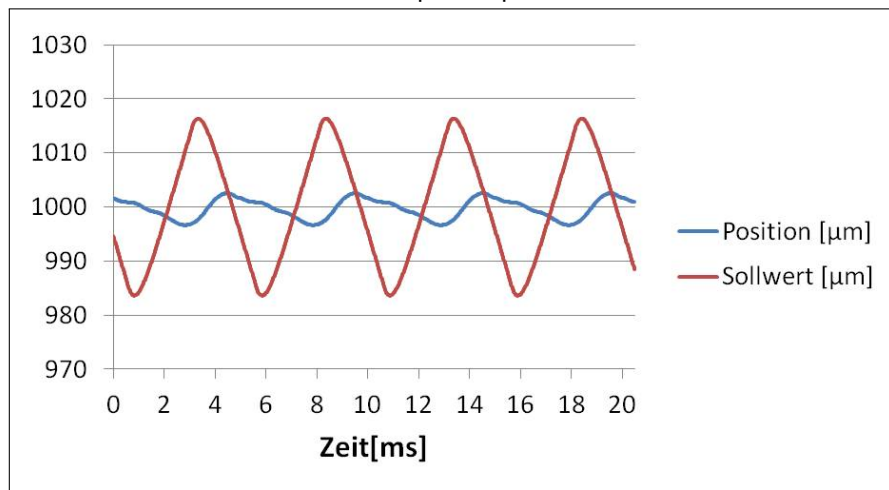


Abb. C.48.: 20 μm Amplitude, 200 Hz

C.3. Abweichungen der Position der Voice Coil vom Sollwert bei Sprungbewegungen

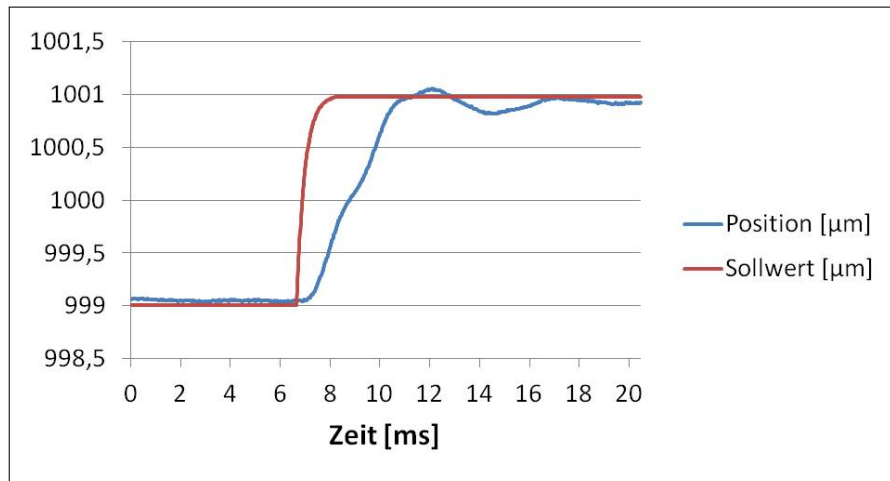


Abb. C.49.: 2 μm Sprung

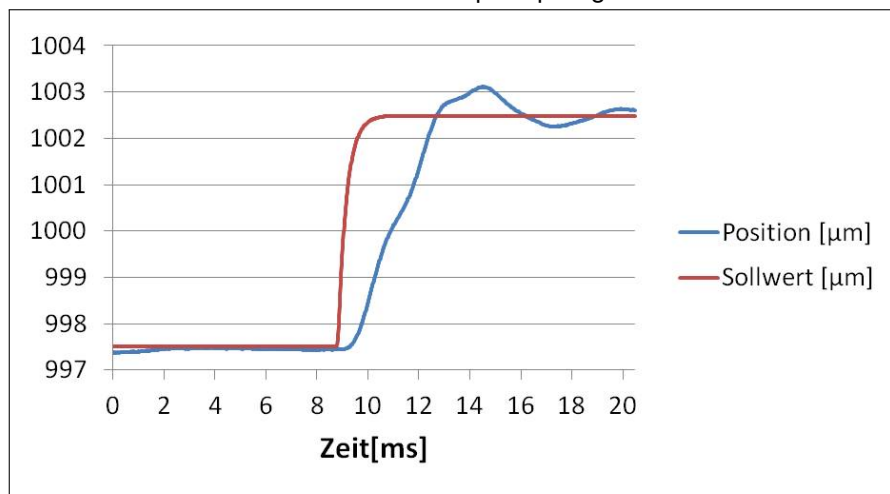


Abb. C.50.: 5 μm Sprung

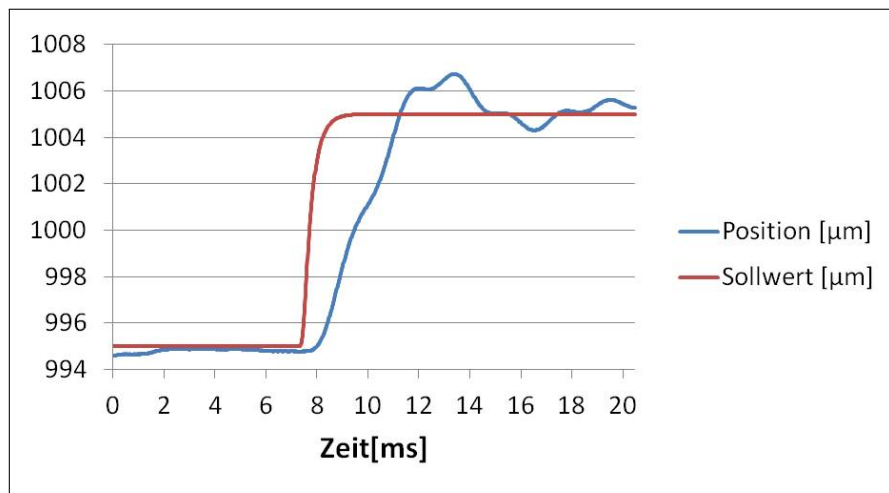


Abb. C.51.: 10 µm Sprung

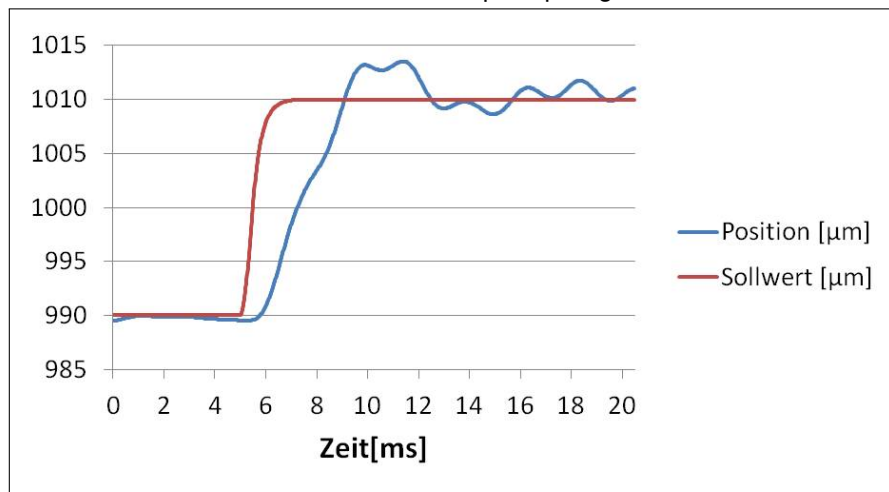


Abb. C.52.: 20 µm Sprung

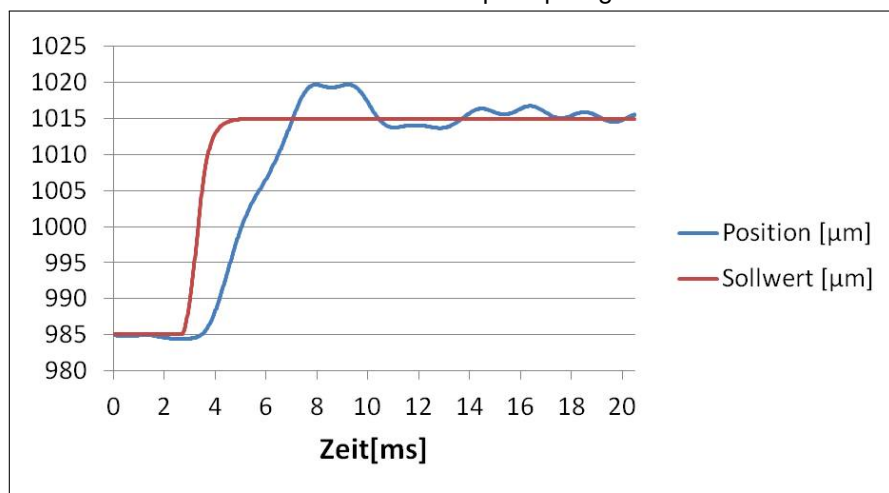


Abb. C.53.: 30 µm Sprung

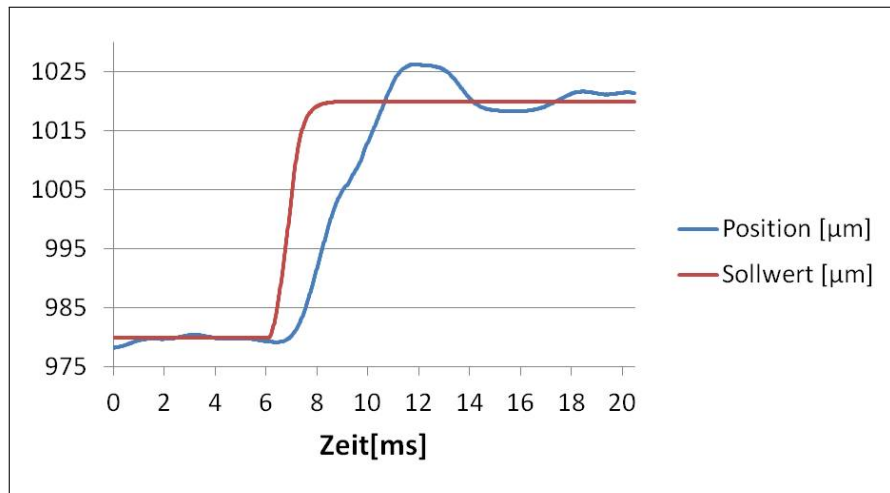


Abb. C.54.: 40 μm Sprung

C.4. Abweichungen der Position der Voice Coil vom Sollwert bei Sinusbewegungen mit Amplitudenkorrektur

Die folgenden Sinuskurven wurden nicht wie in Anhang C.1 durch den Wellengenerator und die Software des Herstellers der Voice Coil generiert, sondern durch die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Software für Trajektorienscans.

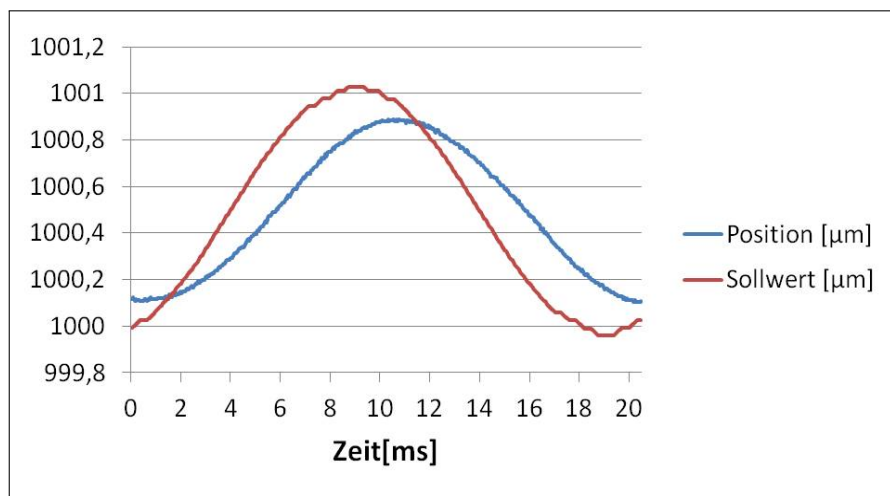


Abb. C.55.: Sinuskurve mit 1 μm Hub bei 50 Hz

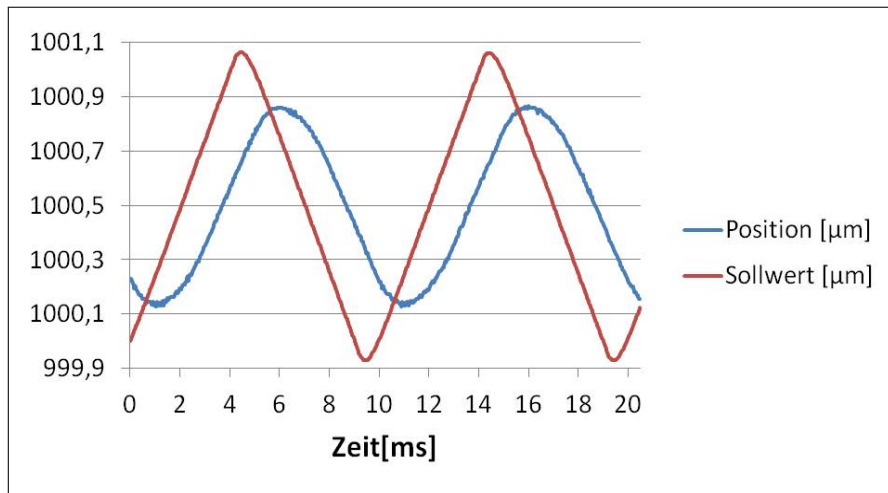


Abb. C.56.: Sinuskurve mit 1 µm Hub bei 100 Hz

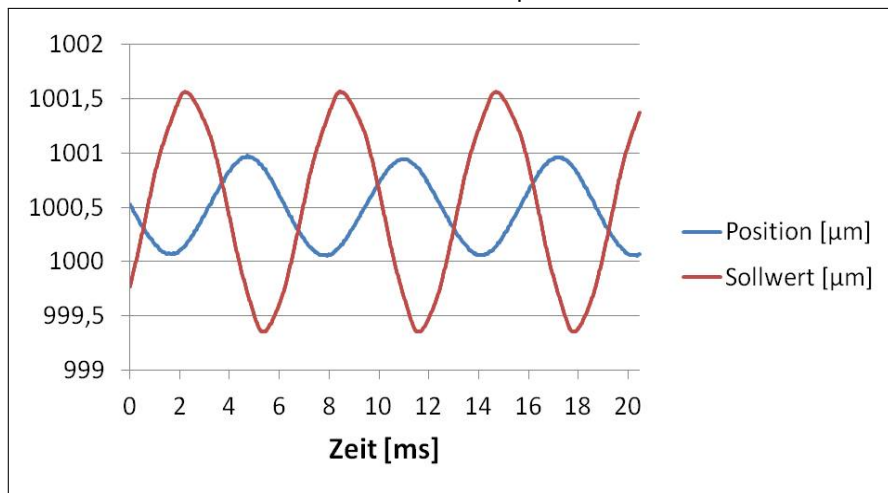


Abb. C.57.: Sinuskurve mit 1 µm Hub bei 160 Hz

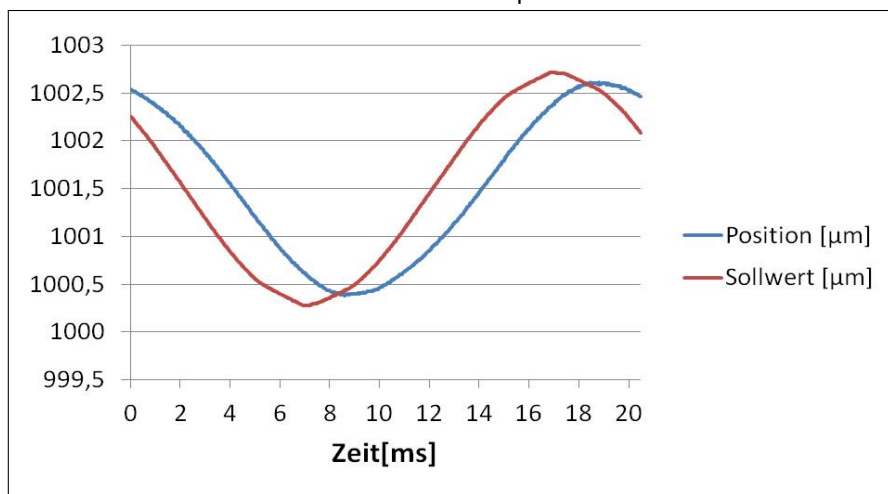


Abb. C.58.: Sinuskurve mit 2,5 µm Hub bei 50 Hz

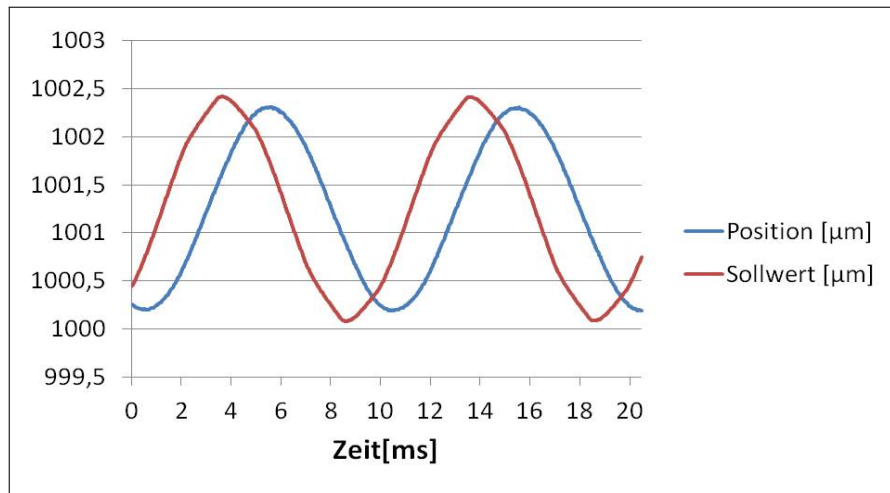


Abb. C.59.: Sinuskurve mit 2,5 µm Hub bei 100 Hz

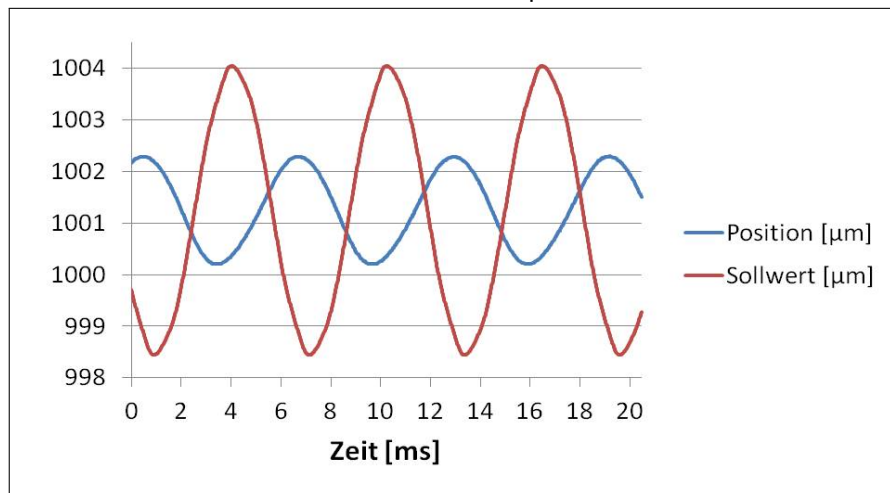


Abb. C.60.: Sinuskurve mit 2,5 µm Hub bei 160 Hz

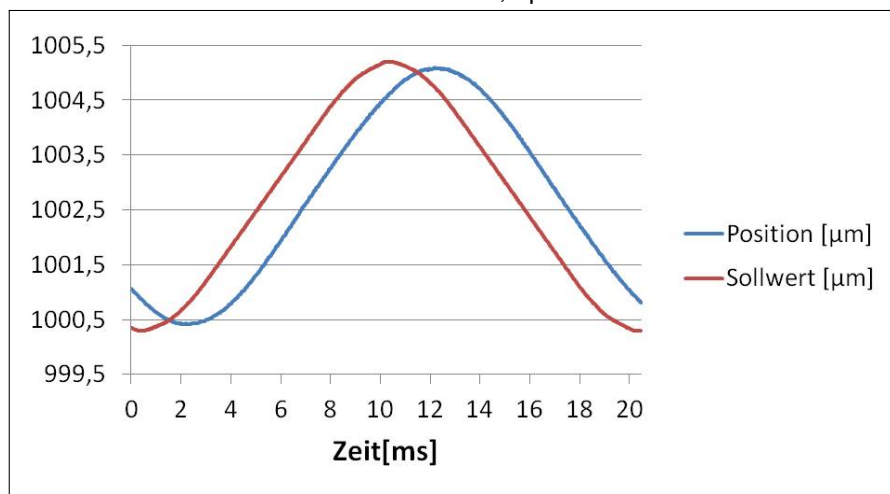


Abb. C.61.: Sinuskurve mit 5 µm Hub bei 50 Hz

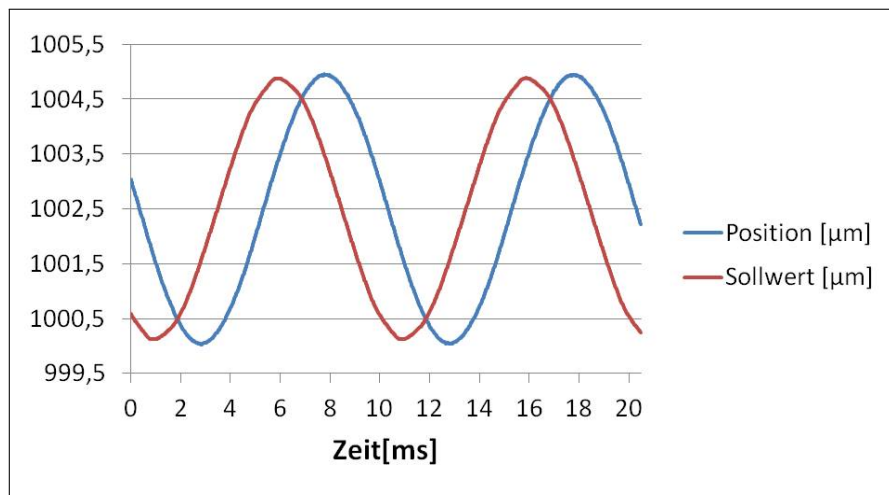


Abb. C.62.: Sinuskurve mit 5 µm Hub bei 100 Hz

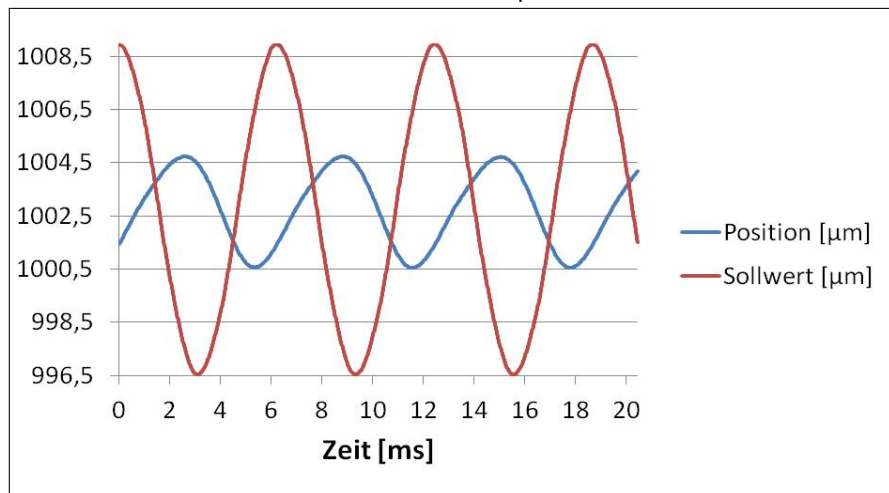


Abb. C.63.: Sinuskurve mit 5 µm Hub bei 160 Hz

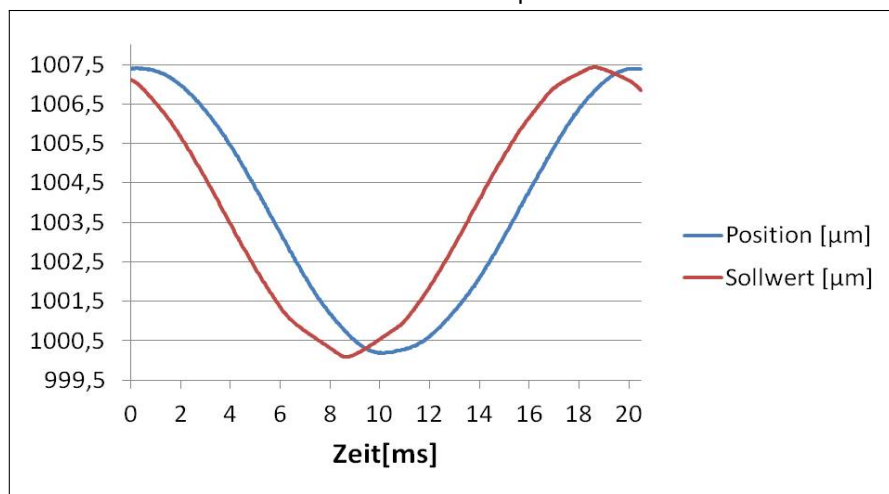
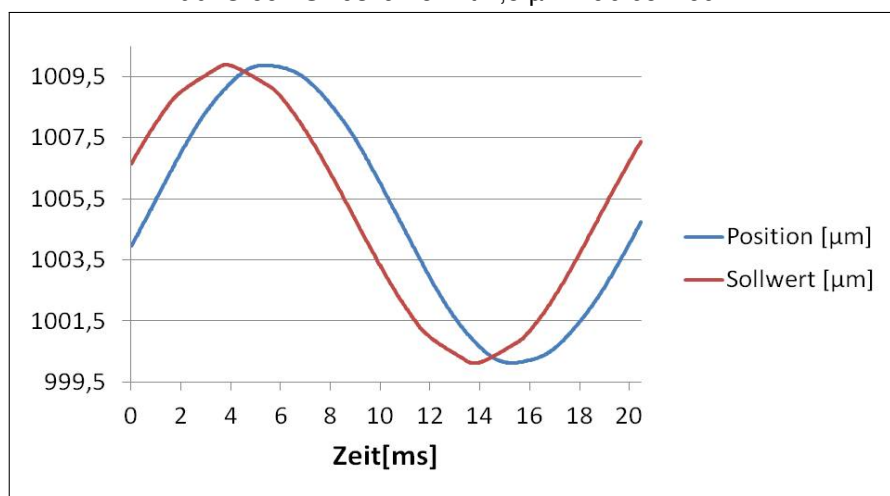
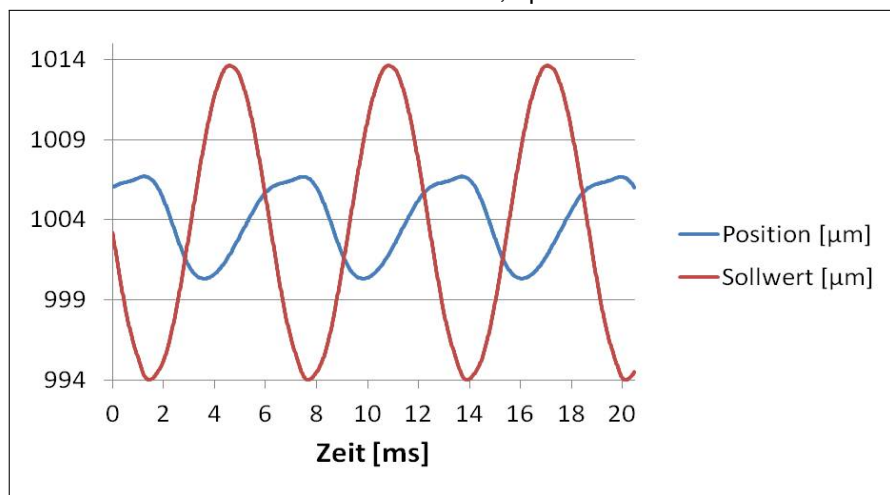
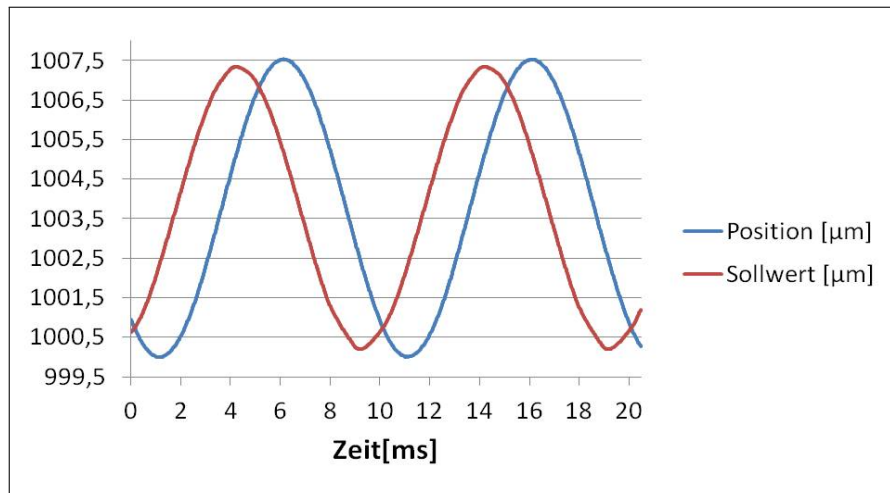


Abb. C.64.: Sinuskurve mit 7,5 µm Hub bei 50 Hz



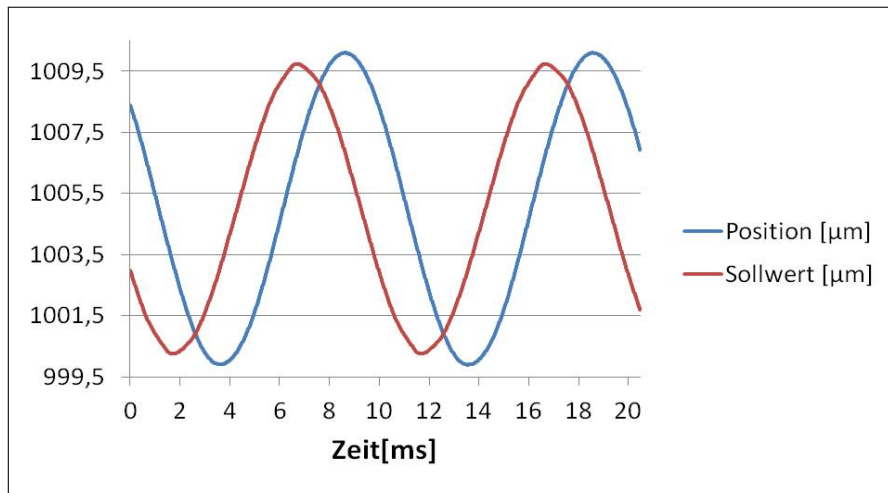


Abb. C.68.: Sinuskurve mit 10 µm Hub bei 100 Hz

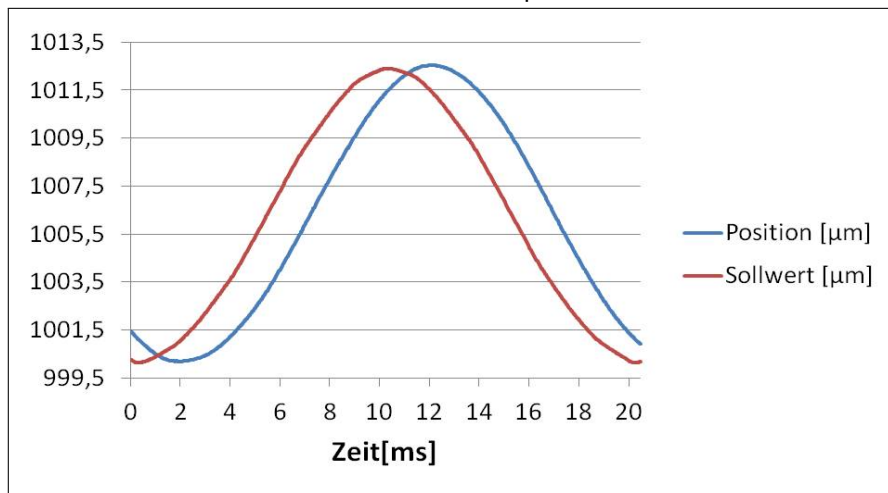


Abb. C.69.: Sinuskurve mit 12,5 µm Hub bei 50 Hz

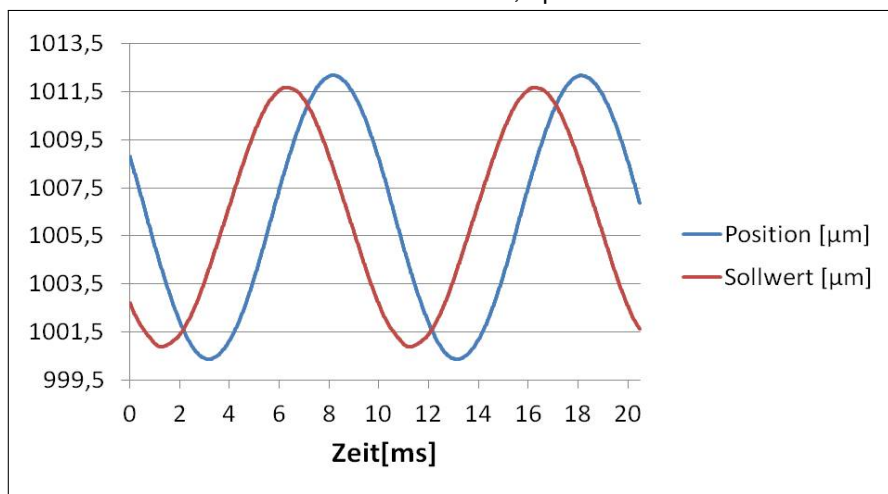


Abb. C.70.: Sinuskurve mit 12,5 µm Hub bei 100 Hz

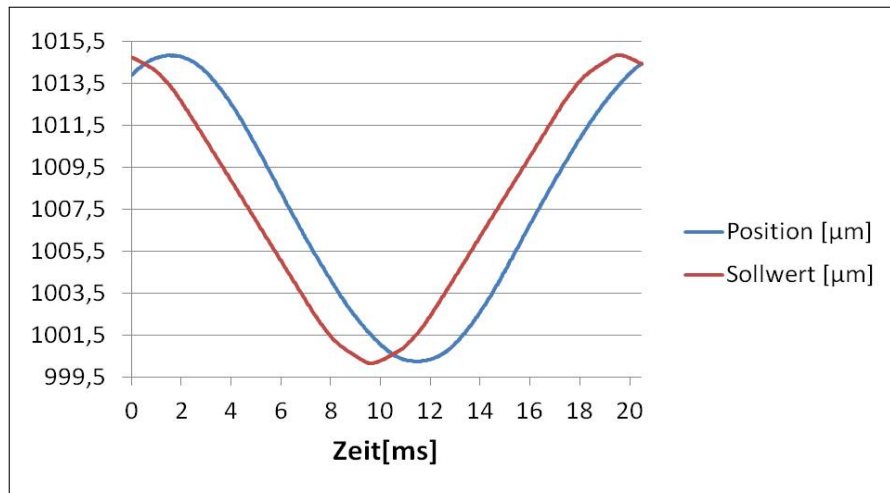


Abb. C.71.: Sinuskurve mit 15 μm Hub bei 50 Hz

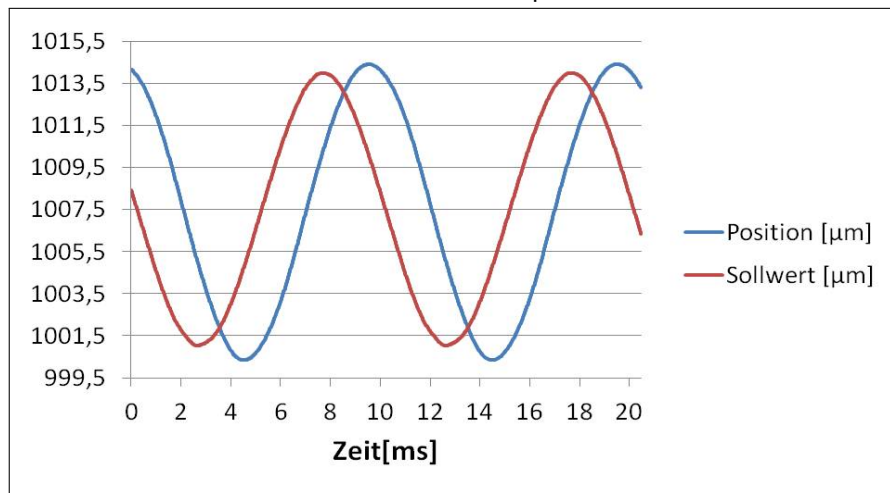


Abb. C.72.: Sinuskurve mit 15 μm Hub bei 100 Hz

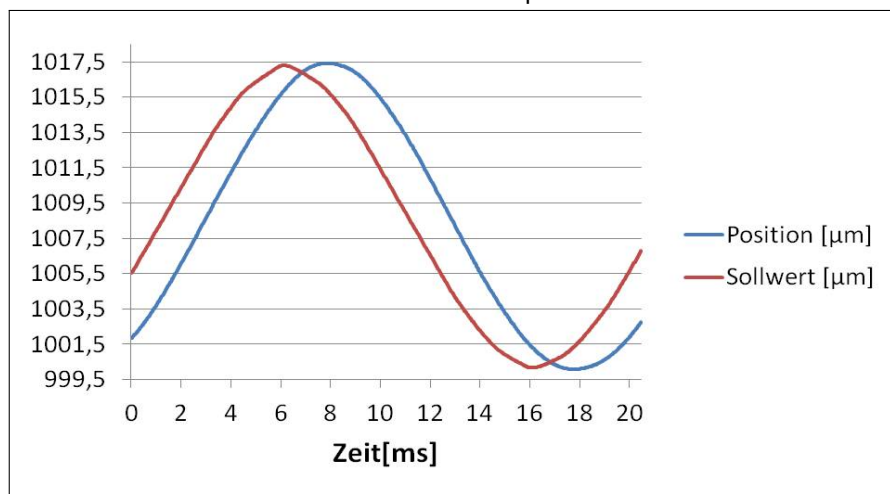
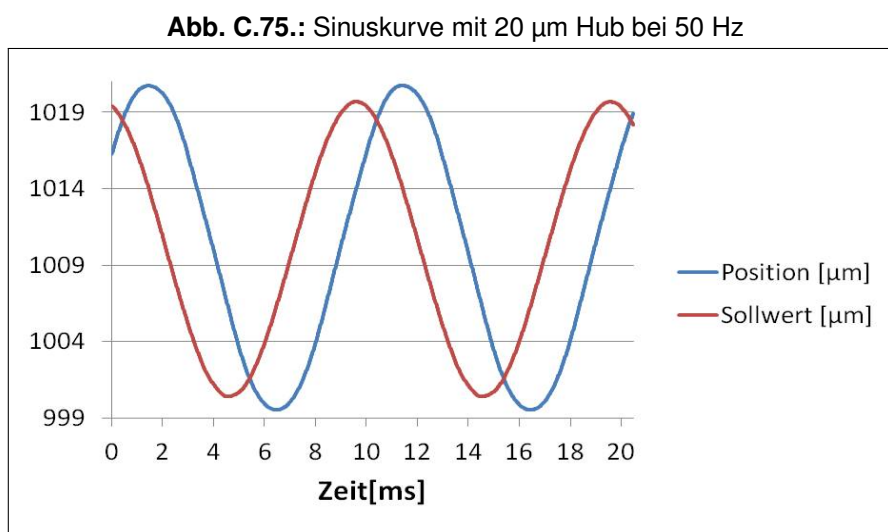
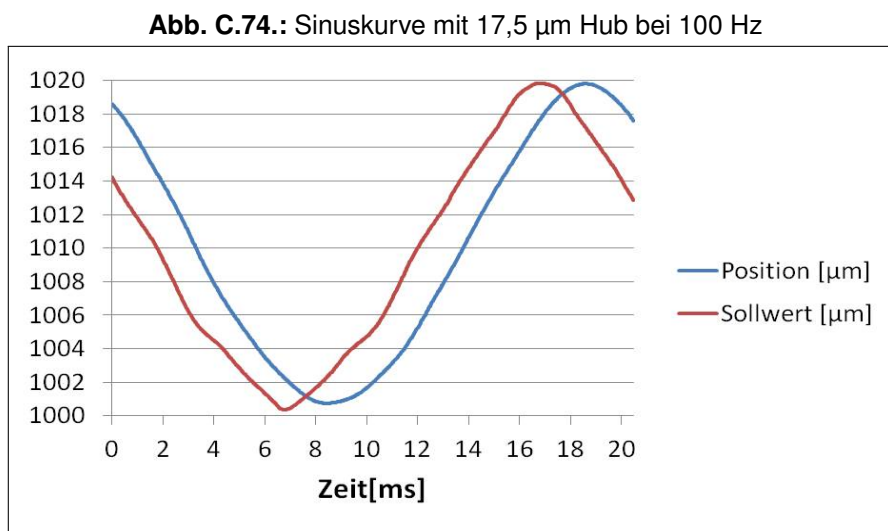
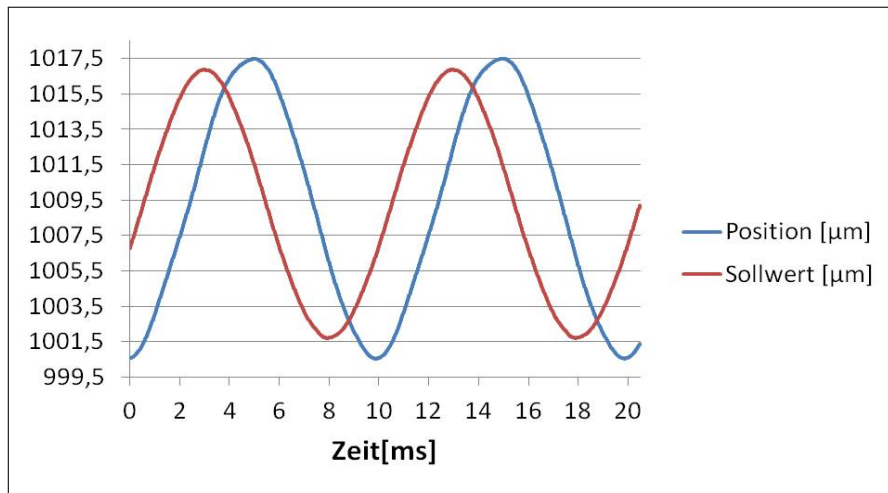


Abb. C.73.: Sinuskurve mit 17,5 μm Hub bei 50 Hz



C.5. Abweichungen der Position der Voice Coil vom Sollwert bei Sprungbewegungen mit Amplitudenkorrektur

Die folgenden Sprünge wurden nicht wie in Anhang C.3 durch den Wellengenerator und die Software des Herstellers der Voice Coil generiert, sondern durch die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Software für Trajektorienscans.

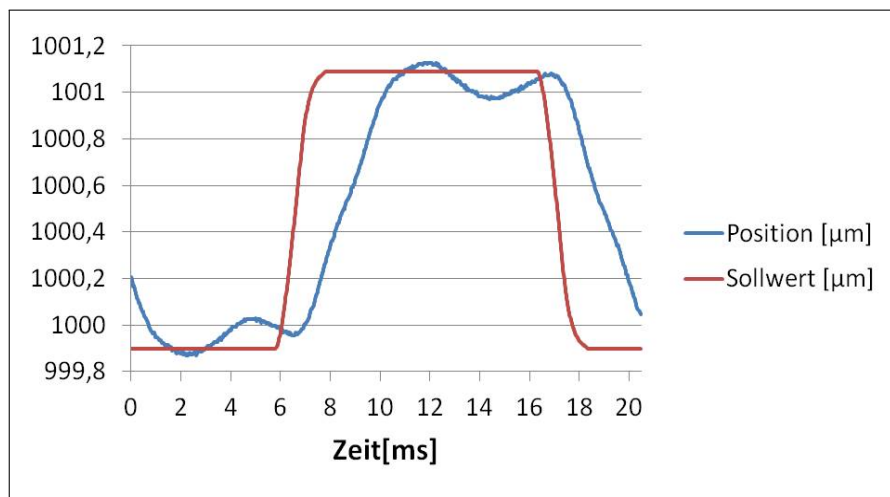


Abb. C.77.: Sinuskurve mit 1 μm Hub bei 50 Hz

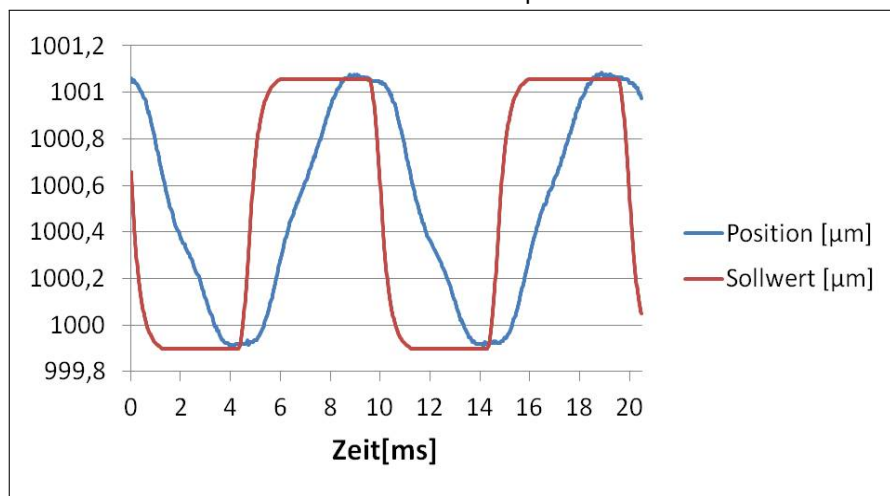


Abb. C.78.: Sinuskurve mit 1 μm Hub bei 100 Hz

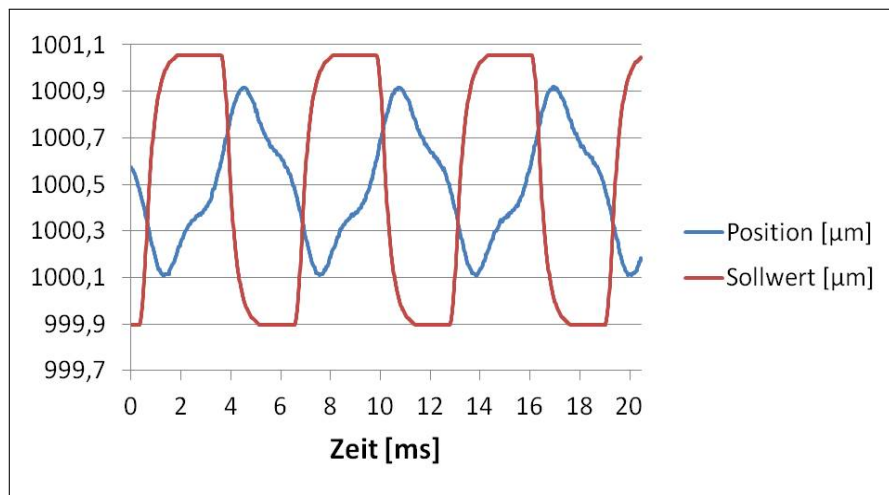


Abb. C.79.: Sinuskurve mit 1 μm Hub bei 160 Hz

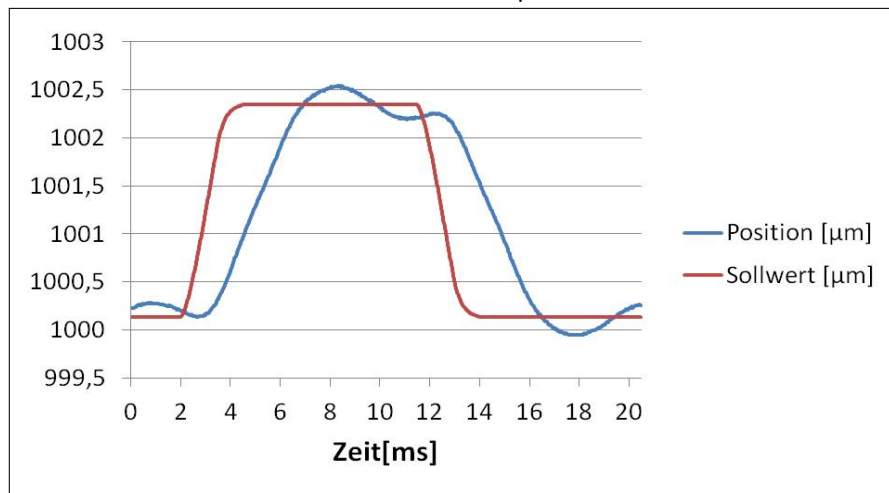


Abb. C.80.: Sinuskurve mit 2,5 μm Hub bei 50 Hz

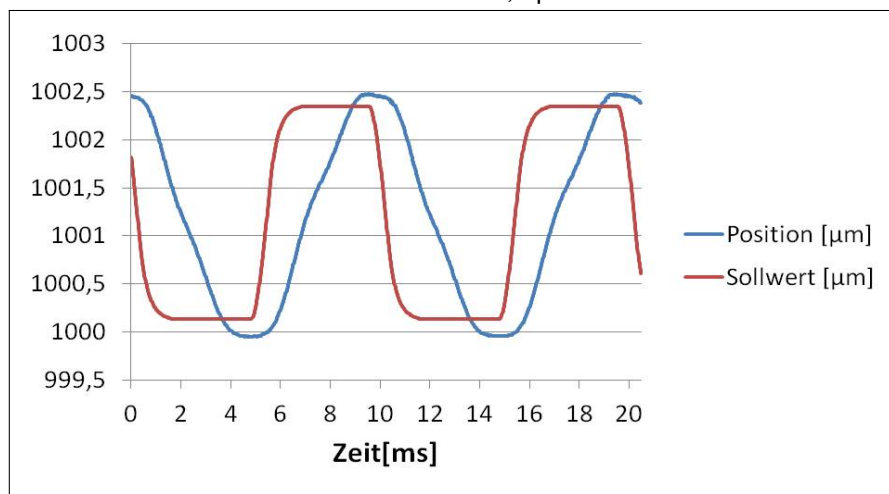


Abb. C.81.: Sinuskurve mit 2,5 μm Hub bei 100 Hz

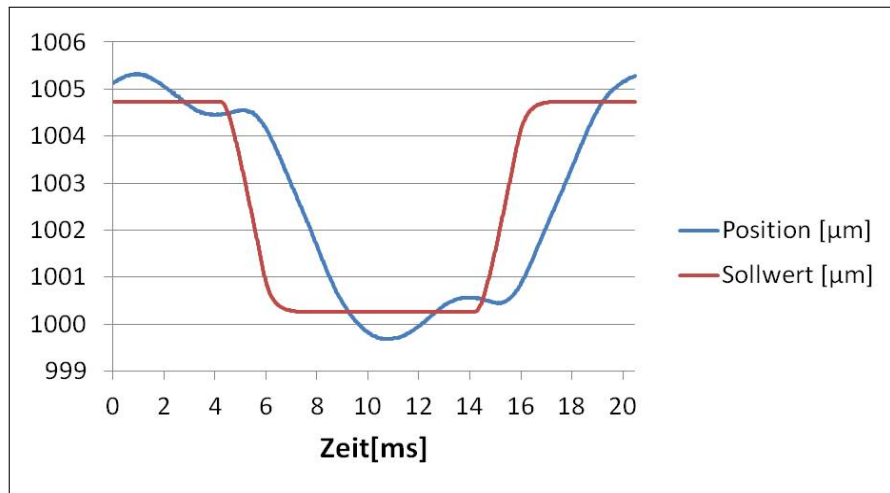


Abb. C.82.: Sinuskurve mit 5 μm Hub bei 50 Hz

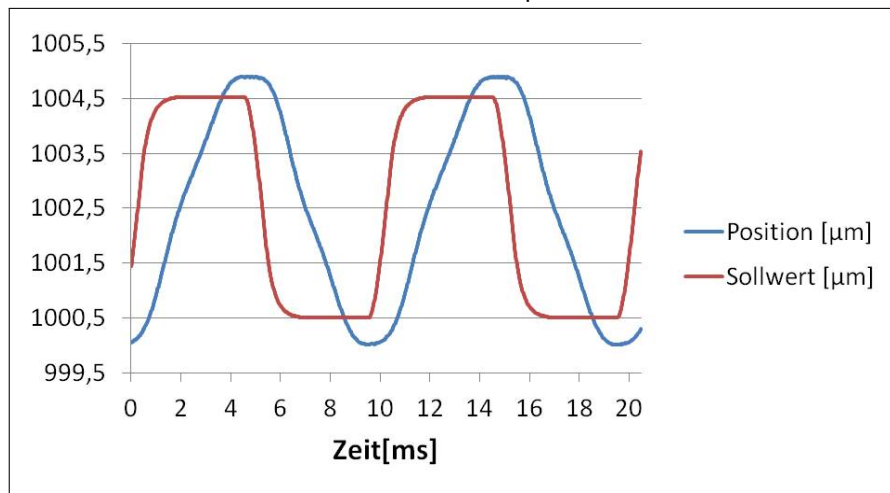


Abb. C.83.: Sinuskurve mit 5 μm Hub bei 100 Hz

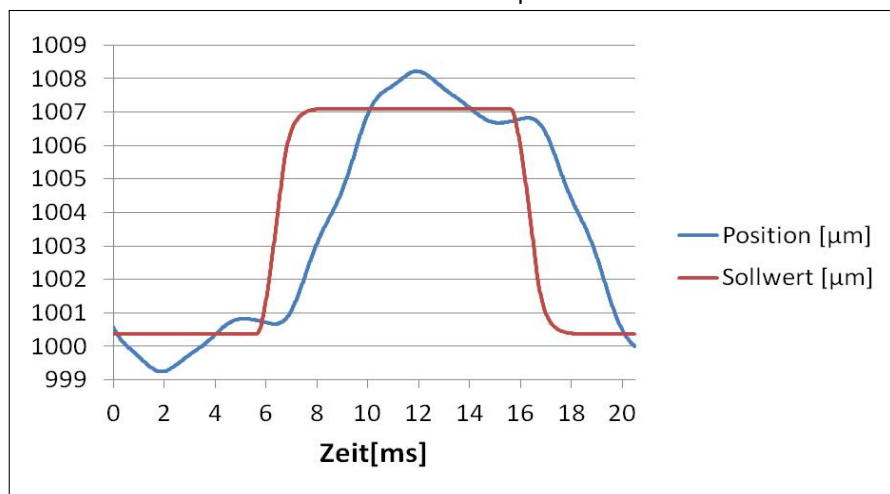


Abb. C.84.: Sinuskurve mit 7,5 μm Hub bei 50 Hz

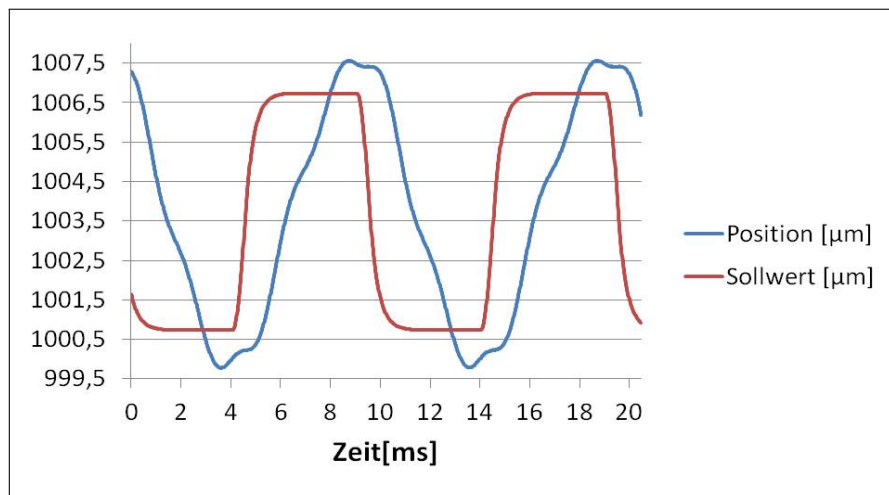


Abb. C.85.: Sinuskurve mit 7,5 μm Hub bei 100 Hz

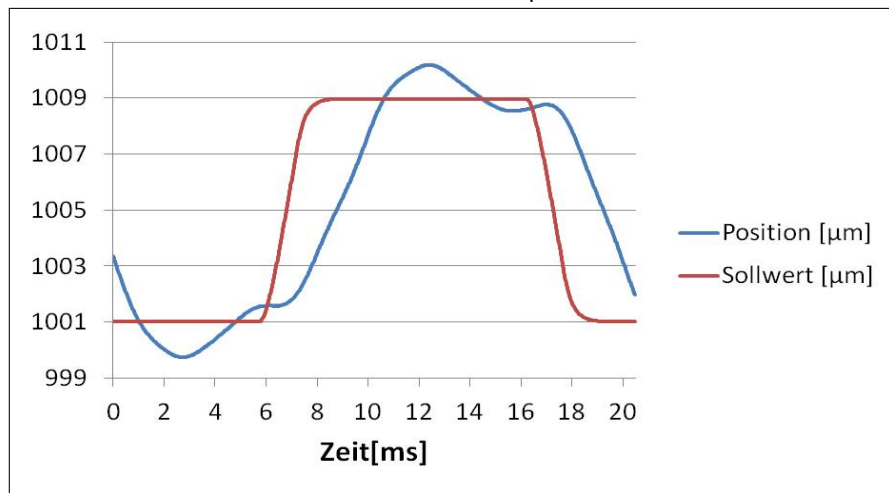


Abb. C.86.: Sinuskurve mit 10 μm Hub bei 50 Hz

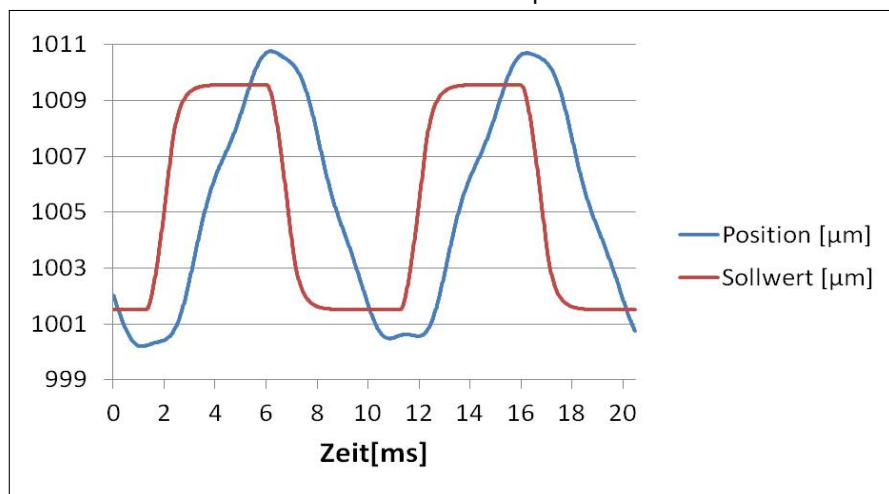


Abb. C.87.: Sinuskurve mit 10 μm Hub bei 100 Hz

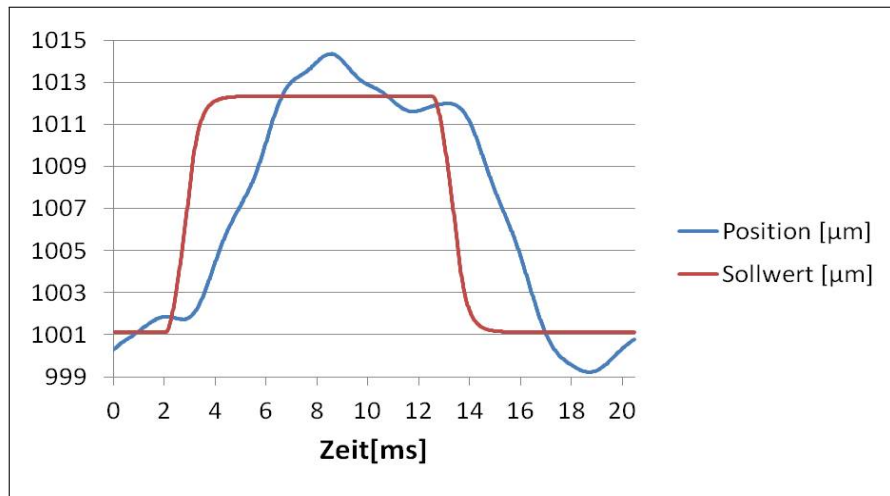


Abb. C.88.: Sinuskurve mit 12,5 μm Hub bei 50 Hz

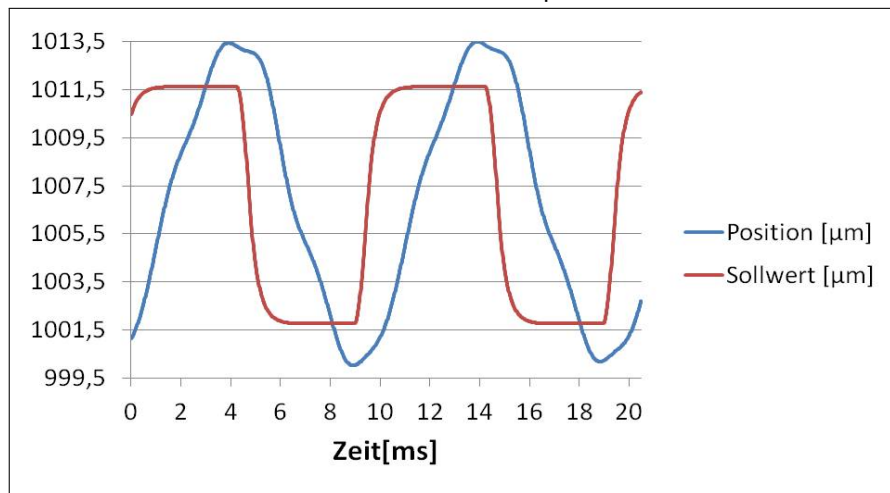


Abb. C.89.: Sinuskurve mit 12,5 μm Hub bei 100 Hz

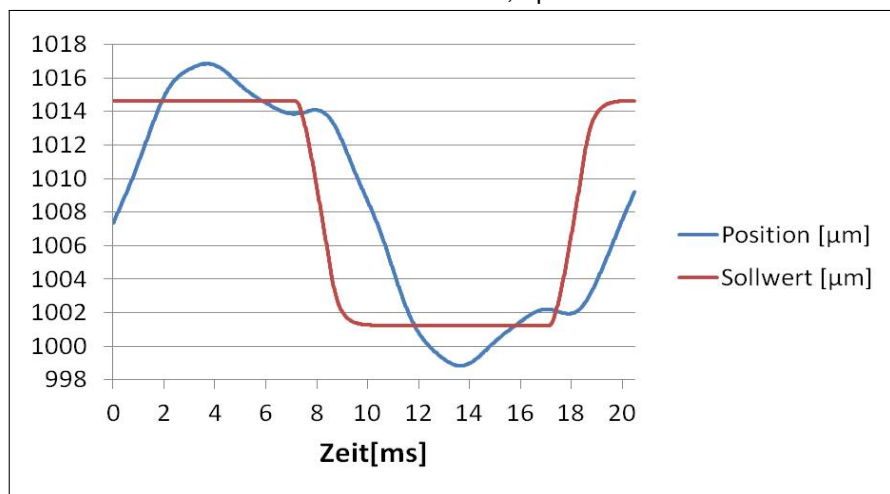


Abb. C.90.: Sinuskurve mit 15 μm Hub bei 50 Hz

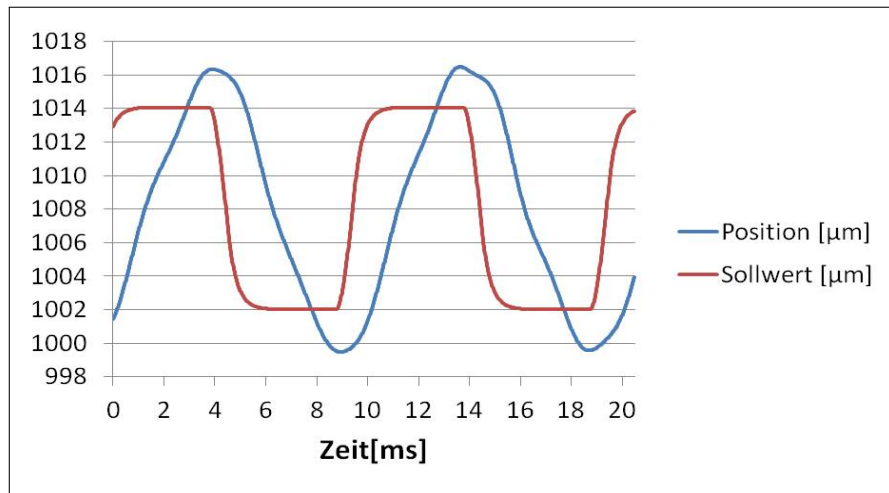


Abb. C.91.: Sinuskurve mit 15 μm Hub bei 100 Hz

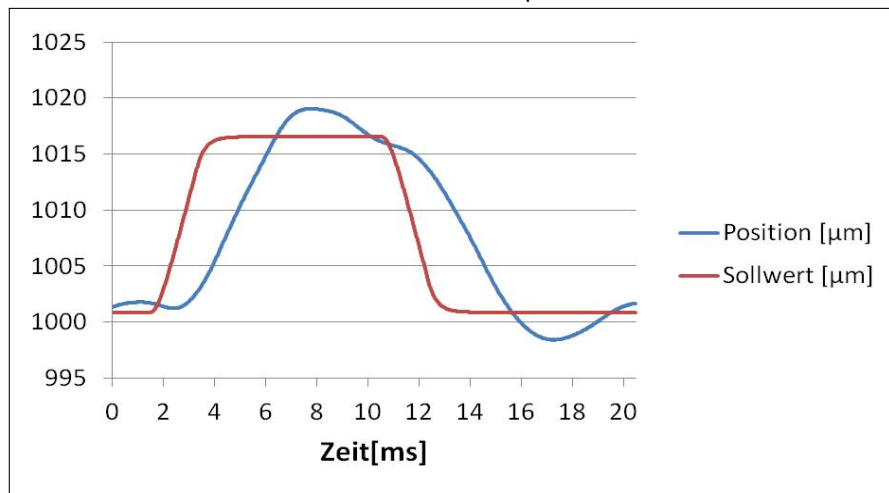


Abb. C.92.: Sinuskurve mit 17,5 μm Hub bei 50 Hz

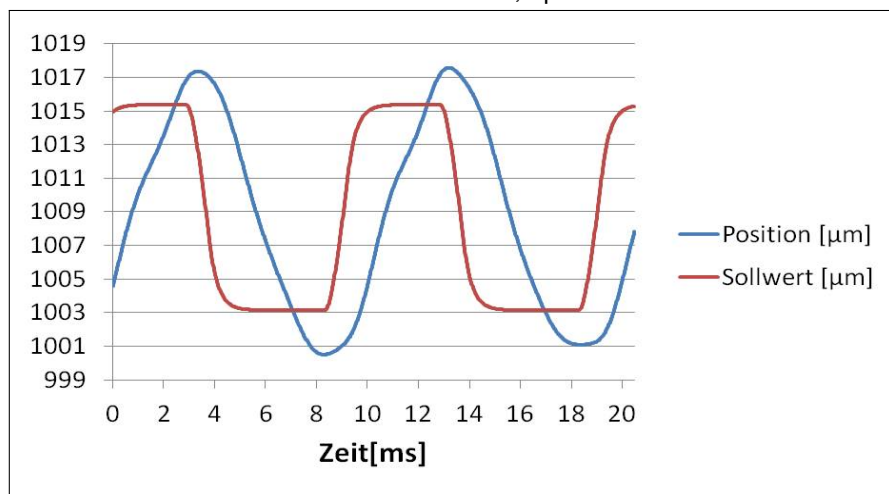


Abb. C.93.: Sinuskurve mit 17,5 μm Hub bei 100 Hz

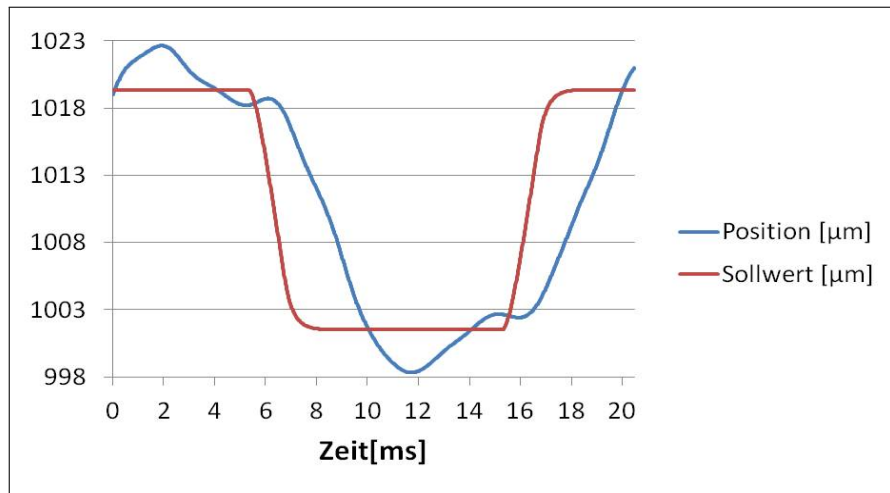


Abb. C.94.: Sinuskurve mit 20 μm Hub bei 50 Hz

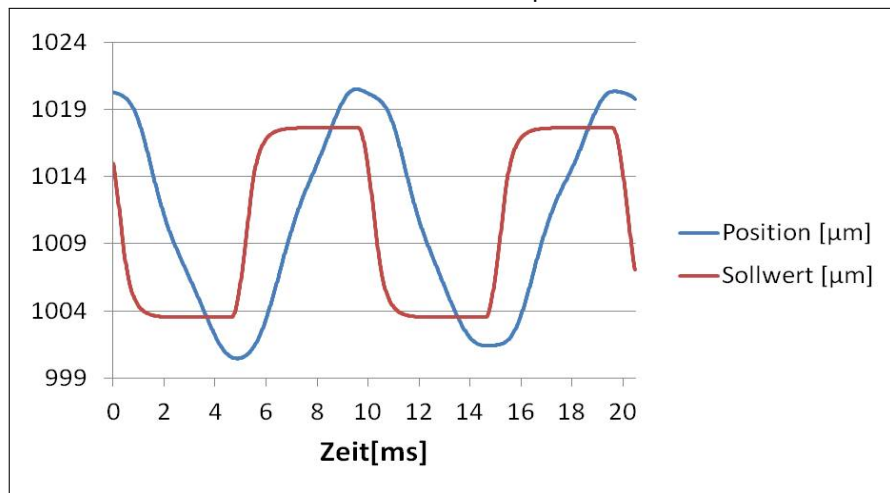


Abb. C.95.: Sinuskurve mit 20 μm Hub bei 100 Hz

D. Benutzeroberflächen zur Zerstörung eines Neurons

Get overview/trajectory scan

Scan

0,0,5,0.000441;0,0,7,7;0.003,0,10,0.00113;0.003,0,3,0.0069170799;0.003,0,4,-0.0048011678;0.003,0,11,0;0.003,0,12,0;0.003,0,7,7;0.003,4,9,25;0.003,2,3,-3.5037848093;0.003,2,4,-3.5037848136;0.003,3,3,0;0.003,3,4,0;0.003,2,11,100000;0.00341,2,11,0;0.00342,2,11,-241176.4705882352;0.00342,1,12,1;0.00342,0,7,5;0.00342,3,3,255025.0106697459;0.00342,3,4,264054.2206505081;0.00351,3,3,-255025.010669746;0.00351,3,4,-264054.2206505082;0.00359,2,11,0;0.0036,0,7,7;0.0036,5,9,0;0.018,2,3,-3.5037848093;0.018,2,4,-3.5037848136;0.018,3,3,0;0.018,3,4,0;0.018,2,11,100000;0.01841,2,11,0;0.01842,2,3,0;0.01842,2,4,0;0.01842,0,7,0;0.01842,0,5,0.00045;0.01842,0,7,7;0.02142,0,10,0.00113;0.02142,0,3,0.00113;0.02142,0,4,0.00113;0.02142,0,5,0.00113;0.02142,0,6,0.00113;0.02142,0,7,0.00113;0.02142,0,8,0.00113;0.02142,0,9,0.00113;0.02142,0,10,0.00113;0.02142,0,11,0.00113;0.02142,0,12,0.00113;0.02142,0,13,0.00113;0.02142,0,14,0.00113;0.02142,0,15,0.00113;0.02142,0,16,0.00113;0.02142,0,17,0.00113;0.02142,0,18,0.00113;0.02142,0,19,0.00113;0.02142,0,20,0.00113;0.02142,0,21,0.00113;0.02142,0,22,0.00113;0.02142,0,23,0.00113;0.02142,0,24,0.00113;0.02142,0,25,0.00113;0.02142,0,26,0.00113;0.02142,0,27,0.00113;0.02142,0,28,0.00113;0.02142,0,29,0.00113;0.02142,0,30,0.00113;0.02142,0,31,0.00113;0.02142,0,32,0.00113;0.02142,0,33,0.00113;0.02142,0,34,0.00113;0.02142,0,35,0.00113;0.02142,0,36,0.00113;0.02142,0,37,0.00113;0.02142,0,38,0.00113;0.02142,0,39,0.00113;0.02142,0,40,0.00113;0.02142,0,41,0.00113;0.02142,0,42,0.00113;0.02142,0,43,0.00113;0.02142,0,44,0.00113;0.02142,0,45,0.00113;0.02142,0,46,0.00113;0.02142,0,47,0.00113;0.02142,0,48,0.00113;0.02142,0,49,0.00113;0.02142,0,50,0.00113;0.02142,0,51,0.00113;0.02142,0,52,0.00113;0.02142,0,53,0.00113;0.02142,0,54,0.00113;0.02142,0,55,0.00113;0.02142,0,56,0.00113;0.02142,0,57,0.00113;0.02142,0,58,0.00113;0.02142,0,59,0.00113;0.02142,0,60,0.00113;0.02142,0,61,0.00113;0.02142,0,62,0.00113;0.02142,0,63,0.00113;0.02142,0,64,0.00113;0.02142,0,65,0.00113;0.02142,0,66,0.00113;0.02142,0,67,0.00113;0.02142,0,68,0.00113;0.02142,0,69,0.00113;0.02142,0,70,0.00113;0.02142,0,71,0.00113;0.02142,0,72,0.00113;0.02142,0,73,0.00113;0.02142,0,74,0.00113;0.02142,0,75,0.00113;0.02142,0,76,0.00113;0.02142,0,77,0.00113;0.02142,0,78,0.00113;0.02142,0,79,0.00113;0.02142,0,80,0.00113;0.02142,0,81,0.00113;0.02142,0,82,0.00113;0.02142,0,83,0.00113;0.02142,0,84,0.00113;0.02142,0,85,0.00113;0.02142,0,86,0.00113;0.02142,0,87,0.00113;0.02142,0,88,0.00113;0.02142,0,89,0.00113;0.02142,0,90,0.00113;0.02142,0,91,0.00113;0.02142,0,92,0.00113;0.02142,0,93,0.00113;0.02142,0,94,0.00113;0.02142,0,95,0.00113;0.02142,0,96,0.00113;0.02142,0,97,0.00113;0.02142,0,98,0.00113;0.02142,0,99,0.00113;0.02142,0,100,0.00113;0.02142,0,101,0.00113;0.02142,0,102,0.00113;0.02142,0,103,0.00113;0.02142,0,104,0.00113;0.02142,0,105,0.00113;0.02142,0,106,0.00113;0.02142,0,107,0.00113;0.02142,0,108,0.00113;0.02142,0,109,0.00113;0.02142,0,110,0.00113;0.02142,0,111,0.00113;0.02142,0,112,0.00113;0.02142,0,113,0.00113;0.02142,0,114,0.00113;0.02142,0,115,0.00113;0.02142,0,116,0.00113;0.02142,0,117,0.00113;0.02142,0,118,0.00113;0.02142,0,119,0.00113;0.02142,0,120,0.00113;0.02142,0,121,0.00113;0.02142,0,122,0.00113;0.02142,0,123,0.00113;0.02142,0,124,0.00113;0.02142,0,125,0.00113;0.02142,0,126,0.00113;0.02142,0,127,0.00113;0.02142,0,128,0.00113;0.02142,0,129,0.00113;0.02142,0,130,0.00113;0.02142,0,131,0.00113;0.02142,0,132,0.00113;0.02142,0,133,0.00113;0.02142,0,134,0.00113;0.02142,0,135,0.00113;0.02142,0,136,0.00113;0.02142,0,137,0.00113;0.02142,0,138,0.00113;0.02142,0,139,0.00113;0.02142,0,140,0.00113;0.02142,0,141,0.00113;0.02142,0,142,0.00113;0.02142,0,143,0.00113;0.02142,0,144,0.00113;0.02142,0,145,0.00113;0.02142,0,146,0.00113;0.02142,0,147,0.00113;0.02142,0,148,0.00113;0.02142,0,149,0.00113;0.02142,0,150,0.00113;0.02142,0,151,0.00113;0.02142,0,152,0.00113;0.02142,0,153,0.00113;0.02142,0,154,0.00113;0.02142,0,155,0.00113;0.02142,0,156,0.00113;0.02142,0,157,0.00113;0.02142,0,158,0.00113;0.02142,0,159,0.00113;0.02142,0,160,0.00113;0.02142,0

Abb. D.1.: Benutzeroberfläche zur Zerstörung eines Neurons (konstante Integrationszeit.) Mit dieser Benutzeroberfläche wird die Intensität des Lasers nach der Zerstörung des Neurons heruntergeregelt. Der Scanbefehl zum Zerstören muss zum Zeitpunkt des Starts bereits gesetzt sein. Es wird anschließend nur noch auf den Trajektorienscan, der vorher über die Taste *Get overview/trajectory scan* hineingeladen wurde, umgeschaltet. Die Dauer der Zerstörung, sowie die Leistung des Lasers danach kann eingestellt werden.

D. Benutzeroberflächen zur Zerstörung eines Neurons

[illegible]

Abb. D.2.: Benutzeroberfläche zur Zerstörung eines Neurons (konstante Intensität.) Die Intensität wird in diesem Fall nach der Zerstörung beibehalten. Zum Messen wird eine sehr kleine Integrationszeit benutzt, um die übrigen Zellen nicht zu sehr zu belasten. Über die Tasten *Get overview/trajectory scan* bzw. *Get destruction scan* werden die jeweiligen Scanbefehle hineingeladen und zu einem Protokoll verknüpft. Die Dauer der Zerstörung kann ebenfalls eingestellt werden.

Abbildungsverzeichnis

1.1. Aufbau eines typischen Fluoreszenzmikroskops	2
1.2. Schema zur Anregung mit ein bzw. zwei Photonen	5
1.3. Aufbau eines typischen Zweiphotonenmikroskops	8
1.4. Abhängigkeit der Fluoreszenz vom axialen Abstand zum Fokus	10
2.1. Yanus Scaneinheit	13
2.2. Experimenteller Aufbau des verwendeten Zweiphotonenmikroskops	14
2.3. Schematische Darstellung der Beleuchtung mit Gradientkontrast nach Dodt	16
2.4. Bilderstapel zur Messung der Punktspreizfunktion an fluoreszierenden Mikrokügelchen	17
2.5. Z-Projektion des Bilderstapels zur Messung der Punktspreizfunktion an fluoreszierenden Mikrokügelchen	17
3.1. Maushalterung	23
3.2. Laboransicht des Versuchstiers auf dem Hexapod unter dem Mikroskop	24
3.3. Benutzeroberfläche des Programms zur Ausrichtung der Probe	25
3.4. Schema zur Theorie der dreidimensionalen Ausrichtung	26
3.5. Dreidimensionale Ausrichtung: Verlorenes Neuron	27
3.6. Effekt der dreidimensionalen Ausrichtung: Schräge Bilder	28
3.7. Effekt der dreidimensionalen Ausrichtung: Bildstapel seitlich betrachtet	28
3.8. Überlagerung von Bildern einer Struktur mit und ohne Ausrichtung	29
4.1. Schematische Darstellung der interauralen Zeitdifferenz akustischer Signale	33
4.2. Zweiphotonenaufnahme eines bipolaren MSO-Neurons	34

4.3. Schematische Darstellung eines Trajektorienscans im Dendriten	35
4.4. Schematische Darstellung eines Trajektorienscans im Ganglion	35
4.5. Rekonstruktion eines Ganglions aus einem Bilderstapel	36
4.6. Trajektorienscan in der xy-Ebene	37
4.7. Messwerte zur Positionsgenauigkeit der Voice Coil	38
4.8. Sinuskurve mit 1 μm Amplitude bei 50 Hz	40
4.9. Dreieckskurve mit 1 μm Amplitude bei 50 Hz	41
4.10. Sprung mit 5 μm Hub	43
4.11. Menü der Software Colibri, in dem man den Trajektorienscan starten kann . .	44
4.12. Benutzeroberfläche für die Ausführung von dreidimensionalen Linientrajek- torien	45
4.13. Benutzeroberfläche für die Bestimmung von Trajektorien, die aus mehreren zweidimensionalen Scans bestehen	49
4.14. Positioniergenauigkeit der Voice Coil im Trajektorienscan am Beispiel einer Sinuskurve bei 160 Hz	57
4.15. Positioniergenauigkeit der Voice Coil am Beispiel eines 10 μm Sprungs bei 50 Hz	59
4.16. Dendrit einer gepatchten MSO-Zelle	61
4.17. Trajektorienscan eines Dendriten einer gepatchten MSO-Zelle	62
4.18. Kalziumionenreaktion in Dendriten einer gepatchten MSO-Zelle	62
4.19. Trajektorienscan in einem Spinalganglion mit 2D ROIs	63
4.20. Kalziumsignal in Neuronen eines Spinalganglions	65
B.1. Kontrastverstärkte Oberfläche des kranialen Fensters im Weitfeld-Modus . . .	77
D.1. Benutzeroberfläche zur Zerstörung eines Neurons (konstante Integrationszeit)	113
D.2. Benutzeroberfläche zur Zerstörung eines Neurons (konstante Intensität) . . .	114

Tabellenverzeichnis

4.1. Abweichung der Amplitude vom Sollwert bei Sinusbewegungen der Voice Coil	40
4.2. Abweichung der Amplitude vom Sollwert bei Dreieckbewegungen der Voice Coil	41
4.3. Zeitverzögerung bei Sinusbewegungen der Voice Coil	42
4.4. Zeitverzögerung bei Dreieckbewegungen der Voice Coil	42
4.5. Faktoren zur Verstärkung der Amplitude bei Sinusbewegungen der Voice Coil beim Trajektorienscan	57
4.6. Zeitdifferenzen zwischen Befehl und Ausführung bei Sinus- und Sprungbewegungen der Voice Coil beim Trajektorienscan	58
4.7. Faktoren zur Korrektur der Amplitude bei Sprungbewegungen der Voice Coil beim Trajektorienscan	60
A.1. Einzelmessungen zur Bestimmung der Punktspreizfunktion	75

Literaturverzeichnis

- [Alb98] M. A. ALBOTA, C. XU, W. W. WEBB. *Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm..* Applied Optics 37(31):7352–6, 1998. 3
- [Alz07] A. ALZHEIMER. *Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde.* Allgemeine Zeitschrift Psychiatrie 64:146–148, 1907. 21
- [Alz13] ALZFORUM. *Mice expressing pathogenic mutations of human genes* , <http://www.alzforum.org/res/com/tra/>, Website last accessed in September 2013. 21
- [Bac01] B. J. BACSKAI, S. T. KAJDASZ, R. H. CHRISTIE, C. CARTER, D. GAMES, P. SEUBERT, D. SCHENK, B. T. HYMAN. *Imaging of amyloid- β deposits in brains of living mice permits direct observation of clearance of plaques with immunotherapy.* Nature Medicine 7(3):369–372, 2001. 9
- [Bas99] P. I. BASTIAENS, A. SQUIRE. *Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell.* Trends in Cell Biology 9(2):48–52, 1999. 2
- [Bea07] M. F. BEAR, B. W. CONNORS, M. A. PARADISO. *Neuroscience.* Lippincott Williams & Wilkins, 2007. 34
- [Bes02] F. BESTVATER, E. SPIESS, G. STOBRAWA, M. HACKER, T. FEURER, T. PORWOL, U. BERCHNER-PFANNSCHMIDT, C. WOTZLAW, H. ACKER. *Two-photon fluorescence absorption and emission spectra of dyes relevant for cell imaging.* Journal of Microscopy 208(Pt 2):108–15, 2002. 3
- [Bra79] G. J. BRAKENHOFF, P. BLOM, P. BARENDs. *Confocal scanning light microscopy with high aperture immersion lenses.* Journal of Microscopy 117(2):219–232, 1979. 3

- [Bra02] A. BRAND, O. BEHREND, T. MARQUARDT, D. MCALPINE, B. GROTHE. *Precise inhibition is essential for microsecond interaural time difference coding*. Nature 417(6888):543–547, 2002. [33](#)
- [Can06] M. B. CANNELL, A. MCMORLAND, C. SOELLER. *Practical tips for two-photon microscopy*. Handbook of biological confocal microscopy, Springer-Verlag US 3:900–905, 2006. [17](#)
- [Car85] K. CARLSSON, P. E. DANIELSSON, R. LENZ, A. LILJEBORG, L. MAJLÖF, N. ASLUND. *Three-dimensional microscopy using a confocal laser scanning microscope*. Optics Letters 10(2):53–5, 1985. [3](#)
- [Cha98] W. C. W. CHAN, N. SHUMING. *Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection*. Science 281:2016–2018, 1998. [1](#)
- [Che85] R. F. CHEN, C. H. SCOTT. *Atlas of fluorescence spectra and lifetimes of dyes attached to protein*. Analytical Letters 18(4):393–421, 1985. [1](#)
- [Chr99] R. CHRISTIE, W. ZIPFEL, R. WILLIAMS, W. WEBB, B. HYMAN. *In-vivo multiphoton imaging of amyloid deposition in transgenic mice*. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 58(5):560, 1999. [19](#)
- [Chr01] R. H. CHRISTIE, B. J. BACSKAI, W. R. ZIPFEL, R. M. WILLIAMS, S. T. KAJDASZ, W. W. WEBB, B. T. HYMAN. *Growth arrest of individual senile plaques in a model of Alzheimer’s disease observed by in-vivo multiphoton microscopy*. The Journal of Neuroscience 21(3):858–864, 2001. [19](#)
- [Cla19] E. D. CLARKE. *Account of a newly discovered variety of green fluor spar, of very uncommon beauty, and with remarkable properties of colour and phosphorescence*. The Annals of Philosophy 14:34–36, 1819. [2](#)
- [Coo03] D. L. COOK, P. C. SCHWINDT, L. A. GRANDE, W. J. SPAIN. *Synaptic depression in the localization of sound*. Nature 421(6918):66–70, 2003. [73](#)
- [Cou10] K. COUCHMAN, B. GROTHE, F. FELMY. *Medial superior olivary neurons receive surprisingly few excitatory and inhibitory inputs with balanced strength and short-term dynamics*. The Journal of Neuroscience 30(50):17111–21, 2010. [33](#), [73](#)
- [Cox84] I. J. COX. *Scanning optical fluorescence microscopy*. Journal of Microscopy 133(2):149–154, 1984. [3](#)

- [Cub95] A. CUBITT, R. HEIM, S. R. ADAMS, A. E. BOYD, L. A. GROSS, R. Y. TSIEN. *Understanding, improving and using green fluorescent proteins*. Trends in Biochemical Sciences 20(11):448–55, 1995. [1](#)
- [Cum02] J. L. CUMMINGS, G. COLE. *Alzheimer disease*. JAMA: the journal of the American Medical Association 287(18):2335–2338, 2002. [21](#)
- [Cze01] P. CZERNEY, F. LEHMANN, M. WENZEL, V. BUSCHMANN, A. DIETRICH, G. J. MOHR. *Tailor-made dyes for fluorescence correlation spectroscopy (FCS)*. Biological Chemistry 382(3):495–8, 2001. [1](#)
- [Dav71] P. DAVIDOVITS, M. D. EGGER. *Scanning laser microscope for biological investigations*. Applied Optics 10(7):1615–9, 1971. [3](#), [4](#)
- [Dav09] M. W. DAVIDSON, R. E. CAMPBELL. *Engineered fluorescent proteins : innovations and applications*. Nature Methods 6(10):713–717, 2009. [1](#), [19](#)
- [Dem09] G. T. DEMPSEY, M. BATES, W. E. KOWTONIUK, D. R. LIU, R. Y. TSIEN, X. ZHUANG. *Photoswitching mechanism of cyanine dyes*. Journal of the American Chemical Society 131(51):18192–3, 2009. [1](#)
- [Den90] W. DENK, J. H. STRICKLER, W. W. WEBB. *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*. Science 248:73–6, 1990. [5](#), [9](#)
- [Den94] W. DENK, K. R. DELANEY, A. GELPERIN, D. KLEINFELD, B. W. STROWBRIDGE, D. W. TANK, R. YUSTE. *Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser scanning microscopy*. Journal of Neuroscience Methods 54(2):151–62, 1994. [4](#)
- [Den95] W. DENK, M. SUGIMORI, R. LLINÁS. *Two types of calcium response limited to single spines in cerebellar Purkinje cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92(18):8279–82, 1995. [19](#)
- [Den96] W. DENK, R. YUSTE, K. SVOBODA, D. W. TANK. *Imaging calcium dynamics in dendritic spines*. Current Opinion in Neurobiology 6(3):372–8, 1996. [19](#)
- [Den97] W. DENK, K. SVOBODA. *Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick*. Neuron 18(3):351–7, 1997. [5](#)

- [Den06] W. DENK, D. W. PISTON, W. W. WEBB. *Multi-photon molecular excitation in laser-scanning microscopy*. Handbook of biological confocal microscopy, Springer-Verlag US 3:535–549, 2006. 6
- [dG99] C. J. DE GRAUW, J. M. VROOM, H. T. VAN DER VOORT, H. C. GERRITSEN. *Imaging properties in two-photon excitation microscopy and effects of refractive-index mismatch in thick specimens*. Applied Optics 38(28):5995–6003, 1999. 16
- [Dia06a] A. DIASPRO, P. BIANCHINI, G. VICIDOMINI, M. FARETTA, P. RAMOINO, C. USAI. *Multi-photon excitation microscopy*. BioMedical Engineering OnLine 5:36, 2006. 4
- [Dia06b] A. DIASPRO, G. CHIRICO, M. COLLINI. *Two-photon fluorescence excitation and related techniques in biological microscopy*. Quarterly Reviews of Biophysics 38(2):97–166, 2006. 4
- [Dic03] M. E. DICKINSON, E. SIMBUERGER, C. W. WATERS. *Multiphoton excitation spectra in biological samples*. Journal of Biomedical Optics 8(3):329–38, 2003. 3
- [Dod13] H.-U. DODT. *Microscopy contrast device*. Patent application number: EP19950915797 19950418, publication number: 0705451(A1) , <http://www.directorypatent.com/EP/EP0705451.html>, Website last accessed in September 2013. 15
- [Don03] C.-Y. DONG, K. KOENIG, P. SO. *Characterizing point spread functions of two-photon fluorescence microscopy in turbid medium*. Journal of Biomedical Optics 8(3):450–459, 2003. 16
- [Dro09] M. DROBIZHEV, S. TILLO, N. MAKAROV, T. HUGHES, A. REBANE. *Absolute two-photon absorption spectra and two-photon brightness of orange and red fluorescent proteins*. The Journal of Physical Chemistry B 113(4):855–859, 2009. 3
- [Dun00] A. K. DUNN, V. P. WALLACE, M. COLENO, M. W. BERNIS, B. J. TROMBERG. *Influence of optical properties on two-photon fluorescence imaging in turbid samples*. Applied Optics 39(7):1194–201, 2000. 9
- [Edw89] F. A. EDWARDS, A. KONNERTH, B. SAKMANN, T. TAKAHASHI. *A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system*. European Journal of Physiology 414:600–612, 1989. 52

- [Fen00] G. FENG, R. H. MELLOR, M. BERNSTEIN, C. KELLER-PECK, Q. T. NGUYEN, M. WALLACE, J. M. NERBONNE, J. W. LICHTMAN, J. R. SANES. *Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP*. *Neuron* 28(1):41–51, 2000. [23](#)
- [Fra08] S. FRANK, F. CLAVAGUERA, M. TOLNAY. *Tauopathy models and human neuropathology: similarities and differences*. *Acta Neuropathologica* 115(1):39–53, 2008. [21](#)
- [FS08] M. FERNÁNDEZ-SUÁREZ, A. Y. TING. *Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells*. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* 9(December):929–43, 2008. [1](#)
- [Fuh10] M. FUHRMANN, T. BITTNER, C. K. JUNG, S. BURGOLD, R. M. PAGE, G. MITTEREGGER, C. HAASS, F. M. LAFERLA, H. KRETZSCHMAR, J. HERMS. *Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer’s disease*. *Nature Neuroscience* 13(4):411–413, 2010. [9](#)
- [Gö7] W. GÖBEL, B. M. KAMPA, F. HELMCHEN. *Imaging cellular network dynamics in three dimensions using fast 3D laser scanning*. *Nature Methods* 4(1):73–79, 2007. [31](#), [72](#)
- [Gö8] J. GÖTZ, L. M. ITTNER. *Animal models of Alzheimer’s disease and frontotemporal dementia*. *Nature Reviews, Neuroscience* 9(7):532–44, 2008. [21](#)
- [GM31] M. GÖPPERT-MAYER. *Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen*. *Annalen der Physik* 9:273–295, 1931. [4](#)
- [Gol69] J. M. GOLDBERG, P. B. BROWN. *Response of binaural neurons of dog superior olivary complex to dichotic tonal stimuli: some physiological mechanisms of sound localization*. *Journal of Neurophysiology* 64, 1969. [33](#)
- [Gol03a] J. H. GOLDBERG, G. TAMAS, D. ARONOV, R. YUSTE. *Calcium microdomains in aspiny dendrites*. *Neuron* 40(4):807–21, 2003. [31](#)
- [Gol03b] J. L. GOLDBERG. *How does an axon grow?*. *Genes & Development* 17(8):941–58, 2003. [34](#)
- [Goo96] C. S. GOODMAN. *Mechanisms and molecules that control growth cone guidance*. *Annual Review of Neuroscience* 19:341–77, 1996. [34](#)

- [Gra08] B. GRAU, J.-C. EILERT, S. MUNCK, H. HARZ. *Adenosine induces growth-cone turning of sensory neurons*. *Purinergic Signalling* 4(4):357–64, 2008. [35](#)
- [Gro10] B. GROTHE, M. PECKA, D. MCALPINE. *Mechanisms of sound localization in mammals*. *Physiological Reviews* 90(3):983–1012, 2010. [33](#)
- [Gru02] J. GRUTZENDLER, N. KASTHURI, W.-B. GAN. *Long-term dendritic spine stability in the adult cortex*. *Nature* 420:812–6, 2002. [24](#)
- [Ham81] O. P. HAMILL, A. MARTY, E. NEHER, B. SAKMANN, F. J. SIGWORTH. *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. *European Journal of Physiology* 391:85–100, 1981. [52](#)
- [Hel99] F. HELMCHEN, K. SVOBODA, W. DENK, D. W. TANK. *In-vivo dendritic calcium dynamics in deep-layer cortical pyramidal neurons*. *Nature Neuroscience* 2(11):989–96, 1999. [19](#)
- [Hel02] F. HELMCHEN, W. DENK. *New developments in multiphoton microscopy*. *Current Opinion in Neurobiology* 12:593–601, 2002. [5](#)
- [Hel05] F. HELMCHEN, W. DENK. *Deep tissue two-photon microscopy*. *Nature Methods* 2(12):932–940, 2005. [5](#), [9](#)
- [Hof09] S. B. HOFER, T. D. MRSIC-FLOGEL, T. BONHOEFFER, M. HÜBENER. *Experience leaves a lasting structural trace in cortical circuits*. *Nature* 457(7227):313–7, 2009. [19](#)
- [Hol09] A. HOLTMAAT, T. BONHOEFFER, D. K. CHOW, J. CHUCKOWREE, V. DE PAOLA, S. B. HOFER, M. HÜBENER, T. KECK, G. KNOTT, W.-C. A. LEE, R. MOSTANY, T. D. MRSIC-FLOGEL, E. NEDIVI, C. PORTERA-CAILLIAU, K. SVOBODA, J. T. TRACHTENBERG, L. WILBRECHT. *Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window*. *Nature Protocols* 4(8):1128–1144, 2009. [20](#), [22](#), [68](#)
- [Ino06] S. INOUÉ. *Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy*. *Handbook of biological confocal microscopy*, Springerverlag Us 3:1–19, 2006. [3](#)
- [Joh98] I. JOHNSON. *Fluorescent probes for living cells*. *The Histochemical Journal* 30(3):123–40, 1998. [1](#)

- [Kai61] W. KAISER, C. G. B. GARRETT. *Two-Photon Excitation in CaF₂: Eu²⁺*. Physical Review Letters 7(6):229–232, 1961. [4](#)
- [Kat11] G. KATONA, A. KASZÁS, G. F. TURI, N. HÁJOS, G. TAMÁS, E. S. VIZI, B. RÓZSA. *Roller coaster scanning reveals spontaneous triggering of dendritic spikes in CA1 interneurons*. Proceedings of the National Academy of Sciences 108(5):2148–53, 2011. [31](#), [72](#), [73](#)
- [Kem98] R. KEMPTER, W. GERSTNER, J. L. V. HEMMEN, H. WAGNER. *Extracting oscillations: Neuronal coincidence detection with noisy periodic spike input*. Neural Computation 10(8):1987–2017, 1998. [73](#)
- [Klu56] R. KLUMPP, H. EADY. *Some measurements of interaural time difference thresholds*. The Journal of the Acoustical Society of America 28:859, 1956. [33](#)
- [Lak09] J. R. LAKOWICZ. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer, 2009. [2](#)
- [Len00] B. LENDVAI, E. A. STERN, B. CHEN, K. SVOBODA. *Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo*. Nature 404:876–81, 2000. [9](#)
- [Lid04] D. S. LIDKE, D. J. ARNDT-JOVIN. *Imaging takes a quantum leap*. Physiology 19:322–325, 2004. [1](#)
- [Lil08] K. P. LILLIS, A. ENG, J. A. WHITE, J. MERTZ. *Two-photon imaging of spatially extended neuronal network dynamics with high temporal resolution*. Journal of Neuroscience Methods 172(2):178–84, 2008. [31](#), [72](#)
- [Luk05] K. A. LUKYANOV, D. M. CHUDAKOV, S. LUKYANOV, V. V. VERKHUSHA. *Photoactivatable fluorescent proteins*. Nature Reviews, Molecular cell biology 6:885–891, 2005. [1](#)
- [Mai60] T. H. MAIMAN. *Stimulated optical radiation in ruby*. Nature 187(8):493–4, 1960. [4](#)
- [Mai99] Z. F. MAINEN, M. MALETIC-SAVATIC, S. H. SHI, Y. HAYASHI, R. MALINOW, K. SVOBODA. *Two-photon imaging in living brain slices*. Methods: A Companion to Methods in Enzymology 18(2):231–9, 1999. [4](#)

- [Man08] M. MANK, O. GRIESBECK. *Genetically encoded calcium indicators*. Chemical Reviews 108:1550–64, 2008. [1](#)
- [Mil58] A. W. MILLS. *On the minimum audible angle*. The Journal of the Acoustical Society of America 30:237, 1958. [33](#)
- [Min88] M. MINSKY. *Memoir on inventing the confocal scanning microscope*. Scanning 10(4):128–138, 1988. [3](#)
- [Min89] A. MINTA, J. P. Y. KAO, R. Y. TSIEN. *Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores*. The Journal of Biological Chemistry 264(14):8171–8178, 1989. [1](#)
- [Mis06] T. MISGELD, M. KERSCHENSTEINER. *In-vivo imaging of the diseased nervous system*. Nature Reviews. Neuroscience 7(6):449–63, 2006. [19](#)
- [Mor86] R. G. MORRIS, M. D. KOPELMAN. *The memory deficits in Alzheimer-type dementia: a review*. The Quarterly Journal of Experimental Psychology 38(4):575–602, 1986. [21](#)
- [Mor97] J. C. MORRIS. *Clinical dementia rating: a reliable and valid diagnostic and staging measure for dementia of the Alzheimer type*. International Psychogeriatrics 9(S1):173–176, 1997. [21](#)
- [Mou82] P. F. MOULTON, ET AL. *Ti-doped sapphire: tunable solid-state laser*. Optics News 8(6):9, 1982. [4](#)
- [Mue99] B. K. MUELLER. *Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding*. Annual Review of Neuroscience 22:351–88, 1999. [34](#)
- [Muj93] R. B. MUJUMDAR, L. A. ERNST, S. R. MUJUMDAR, C. J. LEWIS, A. S. WAGONER. *Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters*. Bioconjugate Chemistry 4(2):105–11, 1993. [1](#)
- [Mun04] S. MUNCK, P. BEDNER, T. BOTTARO, H. HARZ. *Spatiotemporal properties of cytoplasmic cyclic AMP gradients can alter the turning behaviour of neuronal growth cones*. European Journal of Neuroscience 19:791–797, 2004. [35](#)
- [Mur87] B. E. MURDOCH, H. J. CHENERY, V. WILKS, R. S. BOYLE. *Language disorders in dementia of the Alzheimer type*. Brain and Language 31(1):122–137, 1987. [21](#)

- [Neh78] E. NEHER, B. SAKMANN, J. H. STEINBACH. *The extracellular patch clamp: A method for resolving currents through individual open channels in biological membranes*. European Journal of Physiology 375:219–228, 1978. [52](#)
- [Ohe01] M. OHEIM, E. BEAUREPAIRE, E. CHAIGNEAU, J. MERTZ, S. CHARPAK. *Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth*. Journal of Neuroscience Methods 111(1):29–37, 2001. [9](#)
- [Ohk06] K. OHKI, S. CHUNG, P. KARA, M. HÜBENER, T. BONHOEFFER, R. C. REID. *Highly ordered arrangement of single neurons in orientation pinwheels*. Nature 442(7105):925–8, 2006. [19](#)
- [O'M08] D. O'MALLEY. *Chapter 5: Imaging in depth: controversies and opportunities*. Methods in Cell Biology 89(08):95–128, 2008. [9](#)
- [Pet63] L. PETICOLAS, J. P. GOLDSBOROUGH, K. E. RIECKHOFF. *Double photon excitation in organic crystals*. Physical Review Letters 10(2):43–45, 1963. [4](#)
- [Pet97] D. L. PETTIT, S. S.-H. WANG, K. R. GEE, G. J. AUGUSTINE. *Chemical two-photon uncaging: a novel approach to mapping glutamate receptors*. Neuron 19(3):465 – 471, 1997. [74](#)
- [Pia10] K. D. PIATKEVICH, J. HULIT, O. M. SUBACH, B. WU, A. ABDULLA, J. E. SEGALL, V. V. VERKHUSHA. *Monomeric red fluorescent proteins with a large Stokes shift*. Proceedings of the National Academy of Sciences 107(12):5369–74, 2010. [1](#)
- [Pin06] F. PINAUD, X. MICHALET, L. A. BENTOLILA, J. M. TSAY, S. DOOSE, J. J. LI, G. IYER, S. WEISS. *Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes*. Biomaterials 27:1679–1687, 2006. [1](#)
- [Pre09] S. PREIBISCH, S. SAALFELD, P. TOMANCAK. *Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions*. Bioinformatics 25(11):1463–5, 2009. [68](#)
- [PV99] N. PANCHUK-VOLOSHINA, R. P. HAUGLAND, J. BISHOP-STEWART, M. K. BHARGAT, P. J. MILLARD, F. MAO, W.-Y. LEUNG. *Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 47(9):1179–1188, 1999. [1](#)

- [Rad06] R. RADDE, T. BOLMONT, S. A. KAESER, J. COOMARASWAMY, D. LINDAU, L. STOLTZE, M. E. CALHOUN, F. JÄGGI, H. WOLBURG, S. GENGLER, C. HAASS, B. GHETTI, C. CZECH, C. HÖLSCHER, P. M. MATHEWS, M. JUCKER. *A β -42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology*. EMBO Reports 7(9):940–6, 2006. [23](#)
- [Rau09] P. L. RAUTENBERG, B. GROTHE, F. FELMY. *Quantification of the three-dimensional morphology of coincidence detector neurons in the medial superior olive of gerbils during late postnatal development*. The Journal of Comparative Neurology 517(3):385–96, 2009. [33](#), [70](#), [74](#)
- [RG08] U. RESCH-GENGER, M. GRABOLLE, S. CAVALIERE-JARICOT, R. NITSCHKE, T. NANN. *Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels*. Nature Methods 5(9):763–775, 2008. [1](#)
- [RJ00] P. RETZ-JUNGINGER, W. RETZ, M. RÖSLER. *Über die Bedeutung von Persönlichkeitsmerkmalen bei der Alzheimer-Demenz*. Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie 33(1):52–58, 2000. [21](#)
- [Ros95] F. W. ROST. *Fluorescence microscopy*, Band 2. Cambridge University Press, 1995. [2](#)
- [Rya76] A. RYAN. *Hearing sensitivity of the mongolian gerbil, Meriones unguiculatus*. The Journal of the Acoustical Society of America 59:1222, 1976. [33](#)
- [RyC95] S. RAMON Y CAJAL. *Histology of the nervous system of man and vertebrates*. Oxford Univ. Press, New York , 1995. [33](#)
- [Sab00] B. L. SABATINI, K. SVOBODA. *Analysis of calcium channels in single spines using optical fluctuation analysis*. Nature 408(6812):589–93, 2000. [19](#)
- [San94] D. R. SANDISON, W. W. WEBB. *Background rejection and signal-to-noise optimization in confocal and alternative fluorescence microscopes*. Applied Optics 33(4):603–615, 1994. [6](#)
- [Sch03] S. SCHEFF, D. A. PRICE. *Synaptic pathology in Alzheimer’s disease: a review of ultrastructural studies*. Neurobiology of Aging 24(8):1029–1046, 2003. [21](#)

- [Sch11] S. SCHEIBE, M. M. DOROSTKAR, C. SEEBACHER, R. UHL, F. LISON, J. HERMS. *4D in in-vivo 2-photon laser scanning fluorescence microscopy with sample motion in 6 degrees of freedom*. Journal of Neuroscience Methods 200(1):47–53, 2011. [23](#), [24](#), [26](#), [27](#), [28](#), [30](#)
- [See13] C. SEEBACHER. *LabVIEW Laser Scanning Software "Colibri"*, <http://chr.userweb.mwn.de/>, Website last accessed in September 2013. [14](#), [20](#), [44](#)
- [Sha04] N. C. SHANER, R. E. CAMPBELL, P. A. STEINBACH, B. N. G. GIEPMANS, A. E. PALMER, R. Y. TSIEN. *Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein*. Nature Biotechnology 22(12):1567–1572, 2004. [1](#)
- [Sha05] N. C. SHANER, P. A. STEINBACH, R. Y. TSIEN. *A guide to choosing fluorescent proteins*. Nature Methods 2(12):905–9, 2005. [1](#), [19](#)
- [Sha06] P. J. SHAW. *Comparison of widefield/deconvolution and confocal microscopy for three-dimensional imaging*. Handbook of biological confocal microscopy, Springer-Verlag Us 3:453–467, 2006. [16](#)
- [She78] C. J. SHEPPARD, T. WILSON. *Depth of field in the scanning microscope*. Optics Letters 3(3):115–7, 1978. [3](#)
- [Shi62] O. SHIMOMURA, F. H. JOHNSON, Y. SAIGA. *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, aequorea*. Journal of Cellular Physiology 59(3):223–239, 1962. [1](#)
- [SJ11] T. L. SPIRES-JONES, A. D. CALIGNON, M. MEYER-LUEHMANN, B. J. BACSKAI, B. T. HYMAN. *Monitoring protein aggregation and toxicity in Alzheimer's disease mouse models using in-vivo imaging*. Methods (San Diego, Calif.) 53:201–7, 2011. [9](#), [19](#), [21](#)
- [Sko05] J. SKOCH, G. A. HICKEY, S. T. KAJDASZ, B. T. HYMAN, B. J. BACSKAI. *In-vivo imaging of amyloid- β deposits in mouse brain with multiphoton microscopy*. In *Amyloid Proteins*, Seiten 349–363. Springer, 2005. [20](#), [68](#)
- [Spi05] E. SPIESS, F. BESTVATER, A. HECKEL-POMPEY, K. TOTH, M. HACKER, G. STOBRAWA, T. FEURER, C. WOTZLAW, U. BERCHNER-PFANNSCHMIDT,

- T. PORWOL, H. ACKER. *Two-photon excitation and emission spectra of the green fluorescent protein variants ECFP, EGFP and EYFP*. Journal of Microscopy 217(3):200–4, 2005. [3](#)
- [Sto52] G. G. STOKES. *On the change of refrangibility of light*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London 142:463–562, 1852. [2](#)
- [Sto03] C. STOSIEK, O. GARASCHUK, K. HOLTHOFF, A. KONNERTH. *In-vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100(12):7319–24, 2003. [19](#), [31](#), [72](#)
- [Svo97] K. SVOBODA, W. DENK, D. KLEINFELD, D. W. TANK. *In-vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons*. Nature 385:161–5, 1997. [9](#)
- [Svo99] K. SVOBODA, F. HELMCHEN, W. DENK, D. W. TANK. *Spread of dendritic excitation in layer 2/3 pyramidal neurons in rat barrel cortex in vivo*. Nature Neuroscience 2(1):65–73, 1999. [19](#)
- [Svo06] K. SVOBODA, R. YASUDA. *Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience*. Neuron 50(6):823–39, 2006. [19](#)
- [Tra02] J. T. TRACHTENBERG, B. E. CHEN, G. W. KNOTT, G. FENG, J. R. SANES, E. WELKER, K. SVOBODA. *Long-term in-vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex*. Nature 420(19):788–94, 2002. [9](#)
- [Tsa02] P. S. TSAI, N. NISHIMURA, E. J. YODER, E. M. DOLNICK, G. A. WHITE, D. KLEINFELD. *Principles, design, and construction of a two-photon laser-scanning microscope for in vitro and in-vivo brain imaging*. In-vivo optical imaging of brain function, CRC Press Seiten 113–171, 2002. [17](#)
- [Tsi80] R. Y. TSIEN. *New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, sythesis, and properties of prototype structures*. Biochemistry 19(1966):2396–2404, 1980. [1](#)
- [Tsi88] R. Y. TSIEN. *Ruorescence measurement and photodlemical manilmlation of cytosolic free caldum*. Trends in Neurosciences 11(10):419–424, 1988. [1](#)
- [Tsi89] R. Y. TSIEN. *Fluorescent probes of cell signaling*. Annual Review of Neuroscience 12:227–53, 1989. [1](#)

- [Tsi98] R. Y. TSIEN. *The green fluorescent protein*. Annual Review of Biochemistry 67:509–44, 1998. [1](#)
- [Val12] B. VALEUR, ET AL. *Molecular fluorescence: principles and applications*. Wiley-VCH, 2012. [2](#)
- [Wen92] G. L. WENK. *Animal models of Alzheimer's disease*. In *Animal Models of Neurological Disease, I*, Seiten 29–63. Springer, 1992. [21](#)
- [Wil84] T. WILSON, C. SHEPPARD. *Theory and practice of scanning optical microscopy*. London: Academic Press, c1984 1, 1984. [4](#)
- [Xu96a] C. XU, W. W. WEBB. *Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm*. Journal of the Optical Society of America B 13(3):481–91, 1996. [3](#), [7](#)
- [Xu96b] C. XU, R. M. WILLIAMS, W. ZIPFEL, W. W. WEBB. *Multiphoton excitation cross sections of molecular fluorophores*. Bioimaging 4(3):198–207, 1996. [3](#)
- [Xu96c] C. XU, W. ZIPFEL, J. B. SHEAR, R. M. WILLIAMS, W. W. WEBB. *Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93(20):10763–8, 1996. [3](#)
- [Xu02] C. XU, W. WEBB. *Multiphoton excitation of molecular fluorophores and nonlinear laser microscopy*. Topics in fluorescence spectroscopy 5:471–540, 2002. [6](#), [7](#)
- [Yin90] T. YIN, J. CHAN. *Interaural time sensitivity in medial superior olive of cat*. Journal of Neurophysiology 64(2):465–488, 1990. [33](#)
- [Yus95] R. YUSTE, W. DENK. *Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration*. Nature 375:682–684, 1995. [19](#)
- [Zip03] W. R. ZIPFEL, R. M. WILLIAMS, W. W. WEBB. *Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences*. Nature Biotechnology 21(11):1369–77, 2003. [4](#)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. R. Uhl und Prof. Dr. J. Herms

für die Möglichkeit der Promotion in diesem interdisziplinären Arbeitsumfeld und die stete wissenschaftliche und persönliche Förderung durch die Ermöglichung von Kurs- und Kongressteilnahmen.

Dem Zweit- und Drittgutachter

für die Zeit und Mühe bei der Erstellung der Gutachten

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Herms des Zentrums für Neuropathologie

für ein außergewöhnlich gutes Arbeitsklima

Allen Mitarbeitern des BioImagung Zentrums

für ihre große Hilfe bei Fragen durch ihr technisches Know-How

Nicht zuletzt meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meinen Eltern und meinem Mann Mike

für ihre bedingungslose Unterstützung jeglicher Art und ihr stetes Interesse an meiner Arbeit

